

Aus dem Med. Zentrum für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. med. Lohoff
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Untersuchung zur Etablierung einer Real-time-PCR
zum schnellen Screening auf *Clostridium difficile*
aus Patienten- und Umgebungsproben

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ulla Maria Albrecht aus Bad Nauheim
Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 18.08.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Reinier Mutters

1.Korreferent: PD Dr. U.Herz

Inhaltsverzeichnis:

1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung	5
2.1 Epidemiologie.....	5
2.2 Pathogenese	6
2.3 Risikofaktoren	9
2.4 Symptome.....	10
2.5 Immunität	11
2.6 Diagnostik.....	12
2.7 Prävention und Hygiene	14
2.8 Therapie	15
2.9 Ziele dieser Arbeit	17
3. Material und Methoden	19
3.1 Verbrauchsmaterial.....	19
3.2 Laborgeräte.....	21
3.3 Bakterienstämme	23
3.4 Bakterienkultur	24
3.5 Herkunft der Stuhlproben	27
3.6 Toxin Immuno Assay	27
3.7 Herkunft der Umgebungsproben	27
3.8 DNA Extraktion aus Bakterienkulturen	29
3.9 DNA Extraktion aus Stuhlproben.....	29
3.10 DNA Extraktion aus Umgebungsproben.....	30
3.11 Konventionelle PCR.....	31
3.12 Real-time-PCR	32
3.13 Konventionelle PCR Primer und Real-time-PCR Primer und Sonde	34
3.14 Master Mix Ansätze und Cyclerprogramme der Real-time-PCR und konventioneller PCR	35
3.15 Gelelektrophorese.....	38
3.16 Statistische Analyse der Stuhlproben	39
3.17 Statistische Analyse der Umgebungsproben	40

4. Ergebnisse	41
4.1 Sensitivitäts- und Spezifitätsprüfung der Real-time-PCR	41
4.2 Untersuchung der Stuhlproben	43
4.2.1 Vergleich der Ergebnisse des Toxinnachweises mittels ELISA mit dem Nachweis und der Quantifizierung mittels Real-time-PCR	43
4.2.2 Sensitivität und Spezifität der Real-time-PCR in Bezug auf Stuhlproben	45
4.2.3 Nachweis von Toxin A, Toxin B und dem Binarytoxin in Stuhlproben	46
4.2.4 Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	48
4.3 Untersuchung der Umgebungsproben	49
4.3.1 Quantifizierung der Umgebungsproben	49
4.3.2 Korrelationsanalyse der Umgebungsproben.....	51
5. Diskussion.....	54
5.1 Weitere Etablierung und Optimierung des Real-time-PCR Assays basierend auf der Gensequenz der 16S rRNA von <i>Clostridium difficile</i>	54
5.2 Vergleich der Real-time-PCR mit anderen Nachweismethoden von <i>Clostridium difficile</i>	54
5.3 Sensitivität und Spezifität der Real-time-PCR zum Nachweis von <i>Clostridium difficile</i> in Stuhlproben	57
5.4 Toxinnachweis in der DNA aus Stuhlproben	59
5.5 Vergleich von ELISA und konventioneller PCR zum Nachweis von Toxin A und Toxin B	61
5.6 Vergleich der Quantifizierung mittels Real-time-PCR mit dem Toxinnachweis mittels ELISA.....	62
5.7 Risikofaktoren	63
5.8 Quantifizierung von <i>Clostridium difficile</i> aus klinischen Umgebungsproben	64
5.9 Bedeutung von Händehygiene und Präventionsmaßnahmen	66
6. Tabellen	68
7. Abbildungen	79
8. Abkürzungsverzeichnis.....	82
9. Literaturverzeichnis	84
10. Tabellarischer Lebenslauf	97
11. Verzeichnis der akademischen Lehrer	98
12. Danksagung.....	99
13. Ehrenwörtliche Erklärung	100

1. Zusammenfassung

Clostridium difficile ist der häufigste Erreger von Antibiotika-assoziierten Diarrhoen und hat in den letzten Jahren als nosokomialer Problemkeim stark an Bedeutung gewonnen. Das Bakterium ist grampositiv, stäbchenförmig, obligat anaerob und bildet Sporen aus.

Bei einer Antibiotikatherapie wird die natürliche Darmflora gestört und *Clostridium difficile* kann sich leichter ansiedeln. Die Übertragung des Bakteriums erfolgt dabei in der Regel fäkal-oral über die Aufnahme von Sporen. *Clostridium difficile* kann drei bekannte Toxine ausbilden, Toxin A, Toxin B und das Binary-Toxin. Die Toxine verursachen schwere Diarrhoen bis hin zur pseudomembranösen Enterokolitis mit möglichem letalen Ausgang. Das Binary-Toxin wird nicht von allen pathogenen Stämmen gebildet, ist aber mit einer erhöhten Toxizität und Virulenz assoziiert. In den letzten Jahren sind weltweit gehäuft schwere Ausbrüche von *Clostridium difficile* assoziierten Diarrhoen dokumentiert worden, die mit dem neu aufgetretenen, Binary-Toxin bildenden Stamm Nap1/027 in Verbindung gebracht werden. Außerdem wurden vermehrt *Clostridium difficile* assoziierte Diarrhoen außerhalb von Kliniken in der Normalbevölkerung beschrieben. Da infizierte Patienten eine große Zahl von Sporen ausscheiden, die resistent gegen herkömmliche alkoholische Desinfektionsmittel sind, können sie in klinischen Einrichtungen lange überdauern und stellen eine gefährliche Infektionsquelle für andere Patienten und Mitarbeiter dar. Aus diesem Grund müssen strikte Hygieneregeln eingehalten werden, sobald ein Patient an *Clostridium difficile* assoziierter Diarrhoe erkrankt ist. Gleichzeitig kommt einer möglichst schnellen Diagnostik große Bedeutung zu damit zügig entsprechende Maßnahmen eingeleitet werden können.

In dieser Arbeit wurde ein Real-time-PCR Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung der 16S rRNA von *Clostridium difficile* weiteretabliert, wobei das Real-time-PCR Assay eine hohe Sensitivität und Spezifität erreichte. Mit Hilfe der Real-time-PCR wurde extrahierte DNA aus 242 Stuhlproben von zwei Patientengruppen des Klinikums Marburg untersucht. Die erste Patientengruppe umfasste Patienten deren Stuhlprobe zuvor im Toxinimmunoassay auf Toxin A und B von *Clostridium difficile* positiv getestet worden war. In der zweiten Patientengruppe waren Patienten eingeschlossen, die zwar an Diarrhoe erkrankt waren, deren Stuhlprobe aber im

Toxinimmunoassay negativ getestet worden war. Es konnte gezeigt werden, dass das verwendete Real-time-PCR Assay eine schnelle, sensitive und spezifische Methode darstellt, um *Clostridium difficile* in extrahierter DNA aus Stuhlproben zu detektieren. Alle Stuhlproben wurden zur Kontrolle zusätzlich mit einer konventionellen PCR auf Toxin A, Toxin B und das Binary-Toxin untersucht. Bis auf wenige Ausnahmen bestätigte sich im Test auf Toxin A und B das Ergebnis des Toxinimmunoassays. Bei 10 Proben konnte zudem das Binarytoxin nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass auch im Klinikum Marburg bereits neuere Stämme von *Clostridium difficile* Einzug gehalten haben.

In verschiedenen Studien konnte belegt werden, dass die Umgebung von mit *Clostridium difficile* infizierten Patienten stark mit Sporen kontaminiert ist. Um besonders kontaminierte Bereiche aufzuzeigen und die Verbreitung der Sporen zu dokumentieren, wurde DNA aus 531 Abstrichen der Patientenumgebung extrahiert und mit dem weiteretablierten Real-time-PCR Assay untersucht. Dabei wurden Proben aus der Umgebung infizierter Patienten mit Proben der Umgebung nicht infizierter Patienten, die aber mit infizierten Patienten auf einer Station lagen und Proben von Stationen, auf denen seit 6 Monaten kein Fall von *Clostridium difficile* mehr aufgetreten war, verglichen. Es wurde deutlich, dass nicht nur die direkte Umgebung von mit *Clostridium difficile* infizierten Patienten stark kontaminiert ist, sondern auch der ganze Stationsbereich. Auch in den Abstrichproben der Stationen, auf denen seit 6 Monaten kein infizierter Patient mehr gelegen hatte, konnte *Clostridium difficile* nachgewiesen werden. In einer Korrelationsanalyse wurde zudem deutlich, dass vor allem die Hände des Personals eine Hauptinfektionsquelle darstellen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die erforderlichen Hygienemaßnahmen auf den untersuchten Stationen gar nicht oder nur unzureichend eingehalten werden.

Um zu vermeiden, dass sich Stämme wie der neu aufgetretene, hypervirulente Stamm Nap1/027 weiter ausbreiten, ist es daher nötig, dass sowohl den Patienten als auch dem Personal deutlich gemacht wird, dass strikt eingehaltene Hygienemaßnahmen die einzige effektive Möglichkeit darstellen weitere Infektionen zu verhindern. Aufgrund der Resistenz der Sporen gegen alkoholische Desinfektionsmittel kommt hier dem Händewaschen neben der normalen alkoholischen Desinfektion eine besondere Bedeutung zu.

2. Einleitung

Clostridium difficile ist der häufigste Erreger von Antibiotika assoziierten nosokomialen Diarrhöen (CDI). Als nosokomial werden Infektionen bezeichnet, die in zeitlichem Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt oder einer ambulanten medizinischen Maßnahme stehen. Exogene Infektionen werden durch Keime aus der Umgebung des Patienten verursacht, endogene Infektionen entstehen z.B. bei herabgesetzter Immunabwehr des Patienten.

Clostridium difficile ist ein grampositives, obligat anaerobes Stäbchen-Bakterium. Der Erreger bildet subterminal gelegene Endosporen, ist peritrich begeißelt, beweglich und 2,5-5,9 x 0,3-1,5 µm groß. Das Bakterium gehört zur Familie der *Clostridiaceae*.

2.1 Epidemiologie

Die Erstbeschreibung von *Clostridium difficile* erfolgte durch Hall und O'Toole 1935, wobei das Bakterium zuerst im Darm gesunder Kinder nachgewiesen wurde (Hall, O'Toole, 1935). Allerdings wurde der Zusammenhang zwischen Bakterium und pseudomembranöser Colitis erst 1978 von Bartlett *et al.* beschrieben (Bartlett *et al.*, 1978).

Bei bis zu 80% aller gesunden Neugeborenen lässt sich *Clostridium difficile* im Magen-Darm-Trakt nachweisen. Die fehlenden Symptome bei Neugeborenen werden dadurch erklärt, dass die Enterozyten im Darm der Kinder noch nicht ausgereift sind und somit der Rezeptor für Toxin A noch nicht exprimiert wird (Borriello *et al.*, 1998). Im Laufe der kindlichen Entwicklung nimmt die Kolonisierungsrate mit *Clostridium difficile* dann stark ab, so dass bei Erwachsenen der Anteil an *Clostridium difficile* Trägern nur noch 2-5% beträgt, wobei es sich hier um eine asymptomatische Kolonisierung mit nicht Toxin produzierenden Bakterien handelt (Poutanen *et al.*, 2004). In Krankenhäusern sind 10-25% der Patienten mit *Clostridium difficile* kolonisiert, wobei nur ein kleiner Teil der Patienten auch symptomatisch ist. 80% der tatsächlich an CDI erkrankten Patienten sind über 65 Jahre alt (Silva *et al.*, 1994).

Das natürliche Reservoir für *Clostridium difficile* ist die Umwelt, so findet sich das Bakterium in der Erde, in Heu, im Flusswasser, in Schwimmbecken aber auch in Tieren.

Es wird außerdem vermutet, dass Säugetiere wie zum Beispiel Kälber und Schweine ein Reservoir für *Clostridium difficile* darstellen (Rodriguez-Palacios A *et al.*, 2007; Keel *et al.* 2007). In einer Studie konnte *Clostridium difficile* außerdem in Rinderhackfleisch nachgewiesen werden. (Rodriguez-Palacios A *et al.*, 2007a). Die Übertragung erfolgt in den meisten Fällen fäkal-oral über die Sporen, aber auch aerogen und als Aerosol.

2.2 Pathogenese

Die natürliche Flora des menschlichen Gastrointestinaltrakts wirkt als Schutzbarriere gegenüber pathogenen Infektionserregern. Eine Antibiotikatherapie stört dieses Gleichgewicht und pathogene Erreger wie *Clostridium difficile* können sich ansiedeln. Die Infektion mit *Clostridium difficile* erfolgt dabei meistens über die fäkal-orale Aufnahme von Sporen. Im Gegensatz zu den empfindlichen vegetativen Zellen des Bakteriums sind die Sporen sehr resistent gegenüber Hitze, Trockenheit und Säure. Dadurch können die Sporen lange Zeit in der Umwelt überdauern und werden auch bei der Magen-Passage durch die Magensäure nicht zerstört (Poutanen *et al.*, 2004).

Zur klassischen Symptomatik einer CDI kommt es, wenn *Clostridium difficile* Toxine produziert (Larson *et al.*, 1978). *Clostridium difficile* verfügt dabei über die drei bekannten Pathogenitätsfaktoren Toxin A, Toxin B und ein binäres Toxin.

Die Gene von Toxin A und Toxin B sind die beiden größten bekannten bakteriellen Toxine (von Eichel-Streiber *et al.*, 1992). Toxin A und B sind aus drei Domänen aufgebaut und werden über Endozytose in die Zellen eingeschleust. Eine Studie von Hofmann *et al.* zeigte, dass sich am N-Terminus von Toxin B die enzymatische cytotoxisch wirkende Komponente und am C-terminalen Ende die Rezeptor bindende Komponente befindet (Hofmann *et al.*, 1997). Beide Toxine wirken als Glycosyltransferasen und glycosilieren kleine GTP bindende Rho-Proteine, woraus dann die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts resultiert (von Eichel-Streiber *et al.*, 1996). Durch Zerstörung des Zytoskeletts kommt es dann zu einer Abrundung der betroffenen Zelle (Dillon *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Toxin A als auch Toxin B über Glycosilierung der Rho-Proteine letztendlich dann die Apoptose der intestinalen Zellen induzieren (Mahida *et al.*, 1996 ; Fiorentini *et al.*, 1998).

Toxin A und B bewirken außerdem über IL-8 und TNF α Freisetzung aus Monozyten und Makrophagen die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und spielen damit eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion der pseudomembranösen Colitis

(Souza et al., 1997 ; Linevsky et al., 1997). Toxin A wird durch das tcdA Gen kodiert und ist 308 kDa groß. Es wirkt toxisch auf Enterozyten und führt über Störung der Tight Junctions zu einer erhöhten Permeabilität der Darmschleimhaut. Dadurch kommt es zu Elektrolyttransportstörungen, Flüssigkeitsverlust und Funktionsstörungen des Darms.

Toxin B wird durch das tcdB Gen kodiert und ist 270 kDa groß. Es wirkt wesentlich zytotoxischer als Toxin A und kann durch die von Toxin A vermittelte erhöhte Zellwand-Permeabilität auf tiefere Zellschichten einwirken, wodurch es dann zur Schleimhautnekrose kommt. Als Reaktion auf die Toxinwirkung kommt es zur vermehrten Rekrutierung von Entzündungszellen im betroffenen Gebiet. Außerdem lässt sich ein Anstieg der Leukozyten beobachten. Die Gene von Toxin A und B liegen auf dem so genannten PaLoc, dem chromosomalen Pathogenitäts-Locus. Der PaLoc setzt sich aus den Genen tcdA, tcdB, tcdC, tcdD und tcdE zusammen. Die Gene tcdC und tcdD sind regulatorisch wirkende Gene, wobei tcdC als Supressorgen von Toxin A und B, und tcdD als Positiv-Regulator von Toxin A und B wirkt. Das tcdE-Gen ist ein Porin-Gen. (Loo et al., 2005)

Die Gene für das Binary-Toxin, cdtA, 48kDa und cdtB, 99 kDa, liegen außerhalb des PaLoc. Das Binary-Toxin wurde bei dem *Clostridium difficile* Stamm CDT196 1988 von Popoff et al. erstmals nachgewiesen. Es handelt sich bei dem Toxin um eine aktinspezifische ADP-Ribosyltransferase. Insgesamt ist das Binary-Toxin dem ϵ -Toxin von *Clostridium perfringens* ähnlich (Popoff et al., 1988). Das Binary-Toxin besteht aus zwei Komponenten, der enzymatischen Komponente, die durch das cdtA-Gen kodiert wird und der bindenden Komponente, die durch das cdtB-Gen kodiert wird. Die bindende Komponente koppelt an einen Rezeptor der Zelloberfläche an, woraufhin die enzymatische Komponente über Endozytose in das Zellinnere eingeschleust werden kann (Barth et al., 2004). Die enzymatische Komponente des Binary-Toxins wirkt dann als ADP-Ribosyltransferase auf das G-Aktin und verursacht eine Schädigung des Aktinzytoskeletts (Gülke et al., 2001). Das Binary-Toxin wurde nur in Stämmen mit Veränderungen im tcdA- und tcdB-Gen nachgewiesen, sind die Gene für Toxin A und B intakt, kommt es nicht zur Binary-Toxinbildung. Dagegen kann das Binary-Toxin sehr wohl auch in Stämmen ohne Toxin A und B Genen gebildet werden (Stubbs et al., 2000).

Die verschiedenen *Clostridium difficile* Typen variieren in ihrer Toxizität und Virulenz. Nicht jeder *Clostridium difficile* Stamm produziert alle Toxine, manche produzieren gar keine Toxine, teilweise wird nur ein Toxin gebildet.

Außerdem gibt es die verschiedensten Genvariationen. Auffällig ist, dass gerade die Stämme mit Gendeletionen der Toxine oft besonders schwere CDI-Verläufe verursachen. *Clostridium difficile* Stämme, die überhaupt keine Toxine bilden, haben dagegen keine klinische Bedeutung. Es konnte keine Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und gemessenen Toxinlevels gefunden werden (Akerlund et al., 2006).

Beginnend im Oktober 2001 in den USA wurden seit 2002 in verschiedenen Städten Kanadas CDI-Infektionen mit im Vergleich zu früheren Ausbrüchen wesentlich schwereren Krankheitsverläufen und erhöhter Mortalität registriert. Im Zusammenhang mit diesen schweren *Clostridium difficile* Ausbrüchen wurde ein bis dahin unbekannter neuer besonders virulenter *Clostridium difficile* Stamm beschrieben (Loo et al., 2005). Es handelt sich um den in der Pulsfeld-Elektrophorese North American Type 1 (Nap1), in der PCR Ribotypisierung 027 und in der Restriktionsendonuklease Analyse als Gruppe BI bezeichneten Stamm. Im Folgenden wird dieser Stamm der Einfachheit halber als Nap1/027 bezeichnet. Es existieren verschiedene Subtypen des Nap1/027 Stamms. So wird zum Beispiel in der Pulsfeldelektrophorese zwischen Nap1a und Nap1b unterschieden. Das Auffinden weiterer Untergruppen von Nap1/027 ist noch Gegenstand der Forschung.

Nap1/027 verfügt über eine 18-bp Deletion an Position 117 des *tcdC* Gens, welches als Negativ-Regulator für die Toxin A und Toxin B Produktion funktioniert. Als Folge dieser Deletion wird die Produktion von Toxin A und Toxin B nicht mehr durch das *tcdC* Gen gehemmt und es resultiert eine 16-mal größere Toxin A und 23-mal größere Toxin B Produktion (Warny et al., 2005). Außerdem produziert der Nap1/027-Stamm das so genannte Binary-Toxin. Inwieweit das Binary-Toxin bei der erhöhten Pathogenität von Nap1/027 eine Rolle spielt, ist nicht bekannt (Geric et al., 2006). Weiterhin wurde bei Nap1/027 eine vermehrte Sporenbildung nachgewiesen, wodurch der Stamm sich besonders schnell ausbreiten kann (Fawley et al., 2007; Akerlund et al., 2008).

Seit 2002 hat sich der Stamm Nap1/027 in Nordamerika (McDonald et al., 2005) und Europa drastisch ausgebreitet. So wurde dieser hochvirulente Stamm bereits in England (Smith et al., 2005), den Niederlanden (Kuijper et al., 2005), Belgien (Joseph et al., 2005), Frankreich (Tachon et al., 2006), Österreich (Indra et al., 2006), Irland (Long et al., 2007), Finnland (Lyytikäinen et al., 2007), Japan (Kato et al., 2007) und im März 2007 auch in Deutschland (Zaiss et al., 2007) nachgewiesen. Es besteht der begründete Verdacht, dass Nap1/027 Stämme nicht nur wie andere *Clostridium difficile* Stämme

eine Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation und Clindamycin aufweisen, sondern auch resistent sind gegen neuere Fluorchinolone, vor allem gegen Ciprofloxacin. Es wurde außerdem ein Zusammenhang mit der Antibiotika - Therapiedauer beobachtet (Pepin *et al.*, 2005). Der genaue Mechanismus der Resistenz gegen Fluorchinolone ist noch nicht bekannt, allerdings wurde in einer Publikation aus Irland in einigen resistenten Isolaten eine Mutation gefunden, welche eine Aminosäuresubstitution von Thr-82-Ile im *gyrA* Gen bewirkte (Drudy *et al.*, 2007). Die erhöhte Antibiotikaresistenz ist ein Grund für die schnelle Verbreitung (McDonald *et al.*, 2005). Es wurden in den letzten Jahren auch Toxin A-negative, Toxin B-positive Stämme beschrieben. Diese Stämme haben nur ein verkürztes *tcdA* Gen, wodurch eine Produktion von Toxin A nicht möglich ist, verfügen aber anscheinend über größere Virulenz als Toxin A und B positive Stämme. So kam es bei einem Ausbruch dieser Stämme in den USA zum Tod von zwei Patienten (Alfa *et al.*, 2000). Die größere Virulenz von Toxin A negativen Stämmen scheint darin begründet zu sein, dass in diesen Stämmen das Toxin B eine breitere Substratspezifität aufweist. Normalerweise glycosilisieren Toxin A und B nur Rho-G-Proteine. Das Toxin B in den Toxin A negativen Stämmen glycosiliert dagegen auch andere G-Proteine. Es wurden aber auch milde Verläufe einer CDI durch Toxin A negative Stämme und das Vorkommen bei asymptomatischen Trägern geschildert (Kato *et al.*, 1998). Außerdem scheinen Toxin A negative Toxin B positive Stämme auch vermehrt resistent gegen Fluorchinolone und Clindamycin zu sein (Drudy *et al.*, 2007)

Um die weitere Ausbreitung von hochvirulenten Stämmen wie Nap1/027 oder Toxin A negativen /Toxin B positiven Stämmen unter Kontrolle zu bringen wird es daher nötig sein, Antibiotika wie Cephalosporine, Clindamycin und Fluorchinolone möglichst nur gezielt einzusetzen und nicht länger als notwendig. Dies trifft auch für alle anderen Antibiotikaklassen zu, die die Darmflora verändern und somit *C. difficile* einen Standortvorteil verschaffen.

2.3 Risikofaktoren

Risikofaktoren für eine Infektion mit *Clostridium difficile* sind vor allem die Einnahme von Antibiotika wie Amoxicillin, Cephalosporinen, Clindamycin und eventuell auch Fluorchinolonen (McFarland et al., 2007). Besonders die Ausbreitung von hypervirulenten Stämmen scheint im Zusammenhang mit der Einnahme von Fluorchinolonen zu stehen (Pepin et al., 2005). Andererseits führte die Gabe von Moxifloxacin zu einer Reduktion von *C. difficile* (Valiquette et al., 2007). Dies zeigt, dass offenbar die Art der Beeinflussung der gesamten Darmflora durch Antibiotika (Reduktion, Veränderung) die Ursache für ein Aufkeimen von *C. difficile* zu sein scheint.

Weitere Risikofaktoren sind ein Alter des Patienten von über 60 Jahren, Komorbidität durch andere Erkrankungen, Immunsuppression, die Anzahl der eingenommenen Antibiotika, vorherige Krankenhausaufenthalte sowie schlechte intestinale Vorbedingungen wie zum Beispiel Zustand nach großen Bauchoperationen und Sondenernährung (Starr et al., 2003 ; McFarland et al., 2007). Außerdem scheint sich die Einnahme von Protonenpumpenhemmern fördernd auf eine Infektion mit *Clostridium difficile* auszuwirken (Yearsley et al., 2006).

Clostridium difficile assoziierte Erkrankungen kamen bis vor wenigen Jahren in erster Linie nur als nosokomiale Infektionen in Krankenhäusern vor. In letzter Zeit traten jedoch eine gesteigerte Zahl so genannter „community-acquired infections“ auf, also *Clostridium difficile* Infektionen in der Allgemeinbevölkerung, die keine oder nur wenige der oben genannten Risikofaktoren aufweist. Bei diesen „community-acquired infections“ scheint ein Stamm vom Ribotyp 078 eine Rolle zu spielen, welcher anders als die bisher bekannten *Clostridium difficile* Stämme auch häufiger jüngere Personen infiziert. Außerdem wird eine Übertragung über Tiere und den Verzehr von Fleisch diskutiert, da der Stamm 078 genetische Ähnlichkeit mit *Clostridium difficile* Stämmen bei Schweinen und Rindern aufweist (Goorhuis et al., 2008).

2.4 Symptome

Clostridium difficile verursacht ein breites Spektrum an Beschwerden. Infizierte Patienten können entweder direkt nach Antibiotikatherapie Symptome entwickeln, wobei es durch die Antibiotika bedingte Zerstörung der normalen Darmflora zur

Übersiedelung mit *Clostridium difficile* kommt, oder es kann einige Wochen nach der Antibiotikatherapie zum Auskeimen der Sporen kommen (Kelly et al., 1994). Bei normalem Verlauf beträgt die Inkubationszeit nach Ergeraufnahme weniger als eine Woche mit einem Median von zwei Tagen (McFarland et al., 1989). In der Regel setzen die Symptome abrupt ein. Es kommt zu explosiven, sehr wässrigen und faulig riechenden Diarrhoeen. Die Patienten leiden an abdominellen Schmerzen, teilweise haben die Patienten auch Fieber.

Es kann eine erhöhte Leukozytenzahl festgestellt werden. Die Patienten fühlen sich müde und erschöpft, manche Patienten verspüren Übelkeit. Der Krankheitsverlauf kann von leicht verlaufenden Diarrhoeen über stärkste Durchfälle bis hin zur pseudomembranösen Kolitis, zum toxischen Megacolon, paralytischem Ileus und Darmperforation reichen (Kelly et al., 1998). Bei der pseudomembranösen Kolitis bilden sich hellgelbe so genannte Pseudomembranen auf der Darmschleimhaut von Kolon und Rektum. Die Entzündung beschränkt sich auf Kolon und Rectum.

Die unterschiedlichen Krankheitsverläufe werden sowohl durch wirtsabhängige Faktoren als auch durch erregerspezifische Faktoren bestimmt. So sind Patienten mit vorgeschädigter Mucosa und geschwächtem Immunsystem z.B. besonders anfällig für schwere Verläufe, andererseits gibt es aber auch besonders virulente Stämme, wie z.B. den Nap1/027 Stamm. 15-25% aller Patienten erleiden einen Rückfall (Kelly et al., 1994). Eine Studie zeigte, dass eine Leukozytenzahl von $20 \times 10^9/l$ oder höher, eine erhöhte Kreatinin von mindestens $200 \mu\text{mol/l}$ mit schwereren Verläufen und häufigeren Rezidiven einhergehen (Pepin et al., 2004). Es wurde außerdem beobachtet, dass Rezidiv-Patienten mit höherem Lebensalter, erhöhten Leukozytenzahlen und Nierenversagen häufig Komplikationen wie z.B. Kolektomie, Darmperforation oder Tod innerhalb von 30 Tagen im Rahmen der CDI erleiden (Pepin et al., 2006).

2.5 Immunität

Als Reaktion auf eine Infektion mit *Clostridium difficile* werden im Körper des Patienten Antikörper gegen Toxin A, Toxin B und andere *Clostridium difficile* Antigene wie z.B. Oberflächenproteine gebildet. Es handelt sich hierbei um IgG, IgM und IgA Antikörper. In einer Studie konnten bei 60% untersuchter Personen Antikörper gegen *Clostridium difficile* nachgewiesen werden (Kelly et al., 1994).

Die bei einer Primärinfektion gebildeten Antikörper gegen Toxin A schützen den Patienten vor einer erneuten Infektion. Kommt es zu Rezidiven, liegt das meistens an einem zu niedrigen Antikörpertiter von Serum IgG und intestinalen IgA (Kyne et al., 2001). Es wurde beobachtet, dass asymptomatische *Clostridium difficile* Träger ein geringeres Risiko haben im Anschluss an einer manifesten CDI zu erkranken als *Clostridium difficile* negative Patienten (Shim et al., 1998). Passend dazu konnte gezeigt werden, dass bei hohem Antikörpertiter die Krankheitsverläufe milder waren als bei niedrigen Antikörpertitern (Kyne et al., 2000; Warny et al., 1994).

2.6 Diagnostik

Für die Diagnostik von *Clostridium difficile* stehen verschiedene Nachweismethoden zur Verfügung. Der Goldstandard ist der Nachweis der Toxizität in der Zellkultur mit beispielsweise Fibroblasten. Hierbei werden gefilterte zellfreie Stuhlsuspensionen auf Monolayer Zelllinien aufgetragen. Bei positivem Toxizitätsnachweis lässt sich ein zytopathischer Effekt in Form der Abrundung der Zellen ablesen. Das Verfahren ist jedoch sehr zeitaufwendig und teuer.

Eine weitere Möglichkeit ist der kulturelle Nachweis. Wie der Name *Clostridium difficile* schon sagt, ist die Kultur des Bakteriums nicht ganz einfach. Einerseits weil *Clostridium difficile* obligat anaerob wächst und andererseits weil die Kultur leicht von anderen enteralen Keimen überwuchert wird. Zur Anzucht wird Cycloserin-Cefoxitin-Fructose-Selektivagar verwendet. Der kulturelle Nachweis hat den Vorteil, dass auch die Stämme erfasst werden, die kein Toxin bilden. Zudem lässt sich zur Resistenzbestimmung ein Antibiotogramm anfertigen. Auch die Typisierung und Zuordnung von Isolaten ist nur über die Kultur zu erreichen. Um das Problem der Überwucherung mit anderen Keimen zu umgehen, werden Selektivnährmedien mit Cycloserin und Cefoxitin eingesetzt, die die Begleitflora hemmen. Außerdem kann das Auskeimen der Sporen durch den Zusatz von Taurocholat gefördert werden (Wilson et al., 1982). Eine Möglichkeit besteht auch in einer Ethanol-Schock-Behandlung, die nur die Sporen überstehen (Borriello et al., 1981). *Clostridium difficile* wächst als grauweiße Kolonie mit fransigen Rändern und einem Durchmesser von 4-8 mm. Auffällig ist auch der klassische unangenehme Geruch nach Pferden, der durch Parakresol hervorgerufen wird. Der kulturelle Nachweis ist allerdings zeitaufwendig, da die beimpften Agarplatten mindestens 48 Stunden anaerob bebrütet werden müssen.

Die Routinediagnostik setzt deshalb vor allem ELISA-Schnelltests zum Nachweis der *Clostridium difficile* Toxine ein (Barbut et al., 2003). In der Regel werden Testkits verwendet, die beide Toxine A und B erfassen. Es gibt zwar auch Testsysteme, die nur Toxin A oder B nachweisen, da aber nicht jeder Stamm beide Toxine produziert ist es sinnvoller einen Test zu verwenden, der beide Toxine erkennt. Außerdem sind gerade Toxin A negativen Stämme in den letzten Jahren vermehrt aufgetreten (Komatsu et al., 2003). Der in der Diagnostik eingesetzte Schnelltest auf Toxin A und B ist ein ELISA, der über die Bindung von Antikörpern gegen Antigene von Toxin A und B funktioniert. Die optische Dichte bei 450 nm ist dabei proportional zum antikörpergebundenen Toxinantigen. Allerdings hat der verwendete Elisa (s. Material und Methoden) nur eine Sensitivität von 66%-97%. Das bedeutet, es gibt viele falsch-negative Proben (Vanpouce et al., 2001).

Wichtig ist, die Stuhlproben bis zur Testung bei -4°C zu lagern, da mehrmaliges Auftauen und Einfrieren zur Abnahme der Toxine führt (Freeman et al., 2003). Zudem sind ELISA-Tests zum Nachweis der Glutamatdehydrogenase erhältlich. Die Glutamatdehydrogenase wird von allen *Clostridium difficile* Stämmen gebildet. Der Vorteil ist, dass über die Glutamatdehydrogenase auch nicht Toxin bildende Stämme nachgewiesen werden können. Kreuzreaktionen mit anderen Anaerobiern wie z.B. *Peptostreptococcus anaerobius* wirken sich dagegen nachteilig aus (Wilkins et al., 2003). Das Testergebnis eines ELISAS liegt noch am selben Tag vor. ELISA-Tests sind wegen des geringen zeitlichen Aufwands und der einfachen Handhabung gut für Screening- Untersuchungen geeignet. Eine weitere Möglichkeit ist die konventionelle PCR zum Nachweis der Toxin- DNA und 16S rRNA, wobei ein positives Ergebnis der 16 S rRNA PCR auch die asymptomatischen Träger erfasst. Die PCR ist wesentlich aufwendiger als die ELISA Schnelltests. Die konventionelle PCR erreicht durch den Nachweis spezifischer Gensequenzen eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 91,5% (Ackermann et al., 2004). Es wurden auch schon Real-time-PCR Assays zum Nachweis von *Clostridium difficile* beschrieben. Belanger et al. gelang es 2003 ein auf dem Nachweis der Gene von Toxin A und B basierendes Real-time-PCR Assay mit einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 97% zu entwickeln. Die Nachweisgrenze lag bei 5×10^4 CFU/g Stuhl (Belanger et al., 2003). Penders et al konnten ein Real-time-PCR Assay zum Nachweis der 16S rRNA etablieren (Penders et al., 2005). Der große Vorteil der Realtime PCR ist, dass schon innerhalb weniger Stunden ein Ergebnis vorliegt. Allerdings ist die Durchführung einer Real-time-PCR

teurer als eine konventionelle PCR. Der Nachweis von *Clostridium difficile* mittels konventioneller PCR und Real-time-PCR Methoden ist in Routinelabors allerdings nicht etabliert, da noch keine kommerziellen Testkits zur Verfügung stehen.

Im Fall einer pseudomembranösen Kolitis können außerdem in der Rektoskopie die typischen Pseudomembranen gezeigt werden.

2.7 Prävention und Hygiene

Das größte Problem bei der Infektion mit *Clostridium difficile* sind die Sporen, die in der Umgebung des infizierten Patienten persistieren und auf diesem Weg andere Patienten und Mitarbeiter infizieren können.

Die wichtigsten Präventionsmaßnahmen um andere Patienten nicht zu gefährden sind daher die Kontaktisolierung des betroffenen Patienten und die gründliche Unterweisung von Patient und Personal in Hygienemaßnahmen. Betroffene Patienten werden in Einzelzimmern untergebracht, in Ausbruchssituationen kann eine Kohortenisolation erfolgen. Dem Patienten ist eine eigene Toilette zur Verfügung zu stellen. Alkoholische Händedesinfektion und anschließende gründliche mechanische Händereinigung durch Waschen mit Wasser und Seife nach jedem Toilettenbesuch sind weitere grundlegende Vorbeugemaßnahmen.

Auch das Personal muss besondere hygienische Richtlinien einhalten. Bei Patientenkontakt, beim Bettenmachen und bei Reinigungsarbeiten müssen patientenbezogene, langärmelige, geschlossene Schutzkittel getragen werden, die vor Verlassen des Zimmers entsorgt werden.

Außerdem müssen bei Patientenkontakt, Kontakt mit Stuhl des Patienten oder kontaminierten Gegenständen obligatorisch Einmalhandschuhe getragen werden. Es ist wichtig, dass mit bereits kontaminierten Handschuhen keine Gegenstände außerhalb des Zimmers angefasst werden. Die Handschuhe werden vor Verlassen des Patientenzimmers entsorgt.

Nach Patientenkontakt, nach Kontakt mit Stuhl und nach Ausziehen der Handschuhe werden vor Verlassen des Patientenzimmers die Hände desinfiziert und gewaschen. Durch die Desinfektion werden zunächst vitale Erreger abgetötet, durch die anschließende mechanische Reinigung mit Wasser und Seife werden die Sporen entfernt. Besucher der betroffenen Patienten müssen ebenfalls besondere

Hygienemaßnahmen einhalten, bei Patientenkontakt müssen sie Schutzkittel und Einmalhandschuhe tragen, die vor Verlassen des Patientenzimmers entsorgt werden. Außerdem müssen nach Patientenkontakt die Hände desinfiziert und gewaschen werden. Auch Instrumente wie z.B. Fieberthermometer müssen patientenbezogen eingesetzt werden. Die Bettwäsche des Patienten muss bei Verunreinigung und mindestens einmal täglich gewechselt werden. Benutzte Bettwäsche ist in Wäschesäcken innerhalb des Zimmers zu sammeln. Kontaminierte Abfälle aus dem Patientenzimmer unterliegen keiner Regelung als Sonderabfälle und müssen nicht desinfiziert werden. Es ist darauf zu achten, dass täglich eine gründliche Boden und Zimmerreinigung mit einem Flächendesinfektionsmittel vorgenommen wird, das auch Sporen abtötet, wie zum Beispiel Buraton 10F®. Die Reinigungsutensilien müssen danach aufbereitet oder entsorgt werden. Die Hygienemaßnahmen sollten solange durchgeführt werden, bis im Stuhl des Patienten keine Toxine mehr nachweisbar sind, auch wenn sich das Stuhlverhalten des Patienten schon wieder normalisiert hat.

Ist der Patient entlassen, muss das Zimmer mit einem sporenabtötenden Desinfektionsmittel wie zum Beispiel Buraton 10F® oder Perfuran® gereinigt werden (AWMF- Leitlinien).

Das Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen sieht eine nichtnamentliche Meldepflicht im Falle von gehäuften nosokomialen Infektionen vor (§6 Abs. 3 IfSG).

2.8 Therapie

Bei der Therapie einer von *Clostridium difficile* ausgelösten Kolitis muss zwischen einer leichten Infektion und einer schweren Infektion unterschieden werden. Bei einer leichten Infektion genügt es meistens, das zuvor eingenommene Antibiotikum abzusetzen. In schwereren Fällen, bzw. wenn das Absetzen des eingenommenen Antibiotikums nicht ausreicht, wird eine Therapie mit Metronidazol oral oder Vancomycin oral empfohlen. Die Dosis von Metronidazol beträgt dabei 3 x 400mg bis 4 x 500mg bis über 10 Tage, die Dosis von Vancomycin 4 x 125 bis 4 x 500mg über 10 Tage (Grünwald et al, 2010). Metronidazol ist billiger, allerdings kommt es bei der Behandlung in 20-25% der Fälle zu Rezidiven. Der Stamm Nap1/027 scheint auf die Therapie mit Metronidazol schlechter anzusprechen. Bei der Therapie mit Vancomycin besteht die Gefahr der Selektion von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE). Als

Standardtherapie wird daher in der Regel Metronidazol eingesetzt. Bei sehr kranken Patienten und Patienten mit Rezidiven, Patienten auf Intensivstationen, Patienten mit einer Leukozytose größer 20.000, Patienten mit erhöhtem Serumkreatinin und Patienten mit Hypoalbuminämie wird eine Vancomycin-Therapie bevorzugt, da *Clostridium difficile* bisher noch keine Resistenzen gegen Vancomycin gezeigt hat und Vancomycin hohe Wirkspiegel im Darm erreicht (Kujiper et al., 2007).

Begleitend zur Metronidazol- oder Vancomycin-Therapie muss eine ausreichende Wasser und Elektrolytsubstitution erfolgen, um den Verlust durch die Diarrhoe wieder auszugleichen. Eine erfolgreiche Therapie schwerer C. difficile-Infektionen wurde mit dem neuen Antibiotikum Tigecyclin beschrieben (Herpes et al., 2009).

Es gibt auch Alternativen zur Metronidazol- oder Vancomycin-Therapie, die allenfalls vergleichbare Ergebnisse erzielen wie Metronidazol oder Vancomycin und sich noch in der Testphase befinden. Eine Option ist die Therapie mit Nitaxozanid. Nitaxozanid wird normalerweise gegen intestinale Parasiten eingesetzt, erreicht aber auch gute Ergebnisse in der Therapie gegen *Clostridium difficile* und ist schon auf dem Markt erhältlich (Musher et al., 2006). Rifampicin, welches in der Tuberkulosetherapie eingesetzt wird, scheint eventuell auch eine Wirkung gegen *Clostridium difficile* zu haben, eine Kombination mit Metronidazol hat aber keine Vorteile gegenüber der alleinigen Metronidazoltherapie (Lagrotteria et al., 2006). Eine Alternative zu Metronidazol und Vancomycin könnte Tolevamer sein, ein neues, nicht-antibiotisches Polymer das Toxin A und B neutralisiert. Tolevamer ist in der Phase III-Testung gescheitert, da es dort zur Therapie und nicht als „Toxinfänger“ in der sinnvollen Kombination mit Antibiotika eingesetzt wurde. Eine dosislimitierende Nebenwirkung von Tolevamer ist die Hypokaliämie (Louie et al., 2006). Außerdem befinden sich noch weitere neue nicht-antibiotische Pharmazeutika in der Testung, wie zum Beispiel Par-101 (Optimer Pharmaceuticals, San Diego, California, USA), Ramoplanin (Oscient Pharmaceuticals, Waltham, Massachusetts, USA) und Rafalazil (ActivBiotics, Lexington, Massachusetts, USA).

Nach einer Antibiotikatherapie ist die normale Darmflora gestört, so dass sich *Clostridium difficile* ausbreiten kann. Ein therapeutischer Ansatz ist daher, die normale Darmflora mit einer probiotischen Therapie aufrechtzuerhalten oder eventuell sogar zu ersetzen, um so das Wachstum von *Clostridium difficile* zu hemmen. Es gibt verschiedene Therapieansätze mit Cholestyramin, *Lactobacillus GG*, *Saccharomyces boulardii* und Stuhl von Gesunden. Die probiotische Therapie hat aber höchstens

schwache Therapie-Effekte (McFarland et al., 2006). Außerdem wird an Immuntherapien gegen *Clostridium difficile* geforscht. So gibt es Versuche, Immunglobuline i.v. zu geben (McPherson et al., 2006) oder eine Impfung gegen die Toxine zu entwickeln (Sougioultzis et al., 2005). Zu Immuntherapien und Impfungen gegen *Clostridium difficile* sind jedoch noch weitere Studien nötig, um eine Aussage über die Wirksamkeit machen zu können.

2.9 Ziele dieser Arbeit

Clostridium difficile ist die Hauptursache für Antibiotika-assoziierte Diarrhoeen und hat in den letzten Jahren als nosokomialer Problemkeim in Krankenhäusern an Bedeutung stark zugenommen. So wurden seit 2001 vermehrt epidemische Ausbrüche und das Auftreten eines neuen hypervirulenten Stamms Nap1/027 beschrieben. Im Rahmen solcher en- und epidemischer Ausbrüche ist eine schnelle und präzise Diagnostik von großer Wichtigkeit, da die weitere Ausbreitung des Bakteriums nur durch gezielte Hygienemaßnahmen verhindert werden kann.

Eine schnelle und gezielte Diagnostik ist auch unter finanziellen Aspekten von Interesse. So verursachten 2001 in den USA Patienten mit *Clostridium difficile* assoziierter Diarrhoe 54% mehr Kosten als vergleichbare Patienten ohne den Nachweis von *Clostridium difficile*. Die höheren Kosten werden unter anderem durch den verlängerten Krankenhausaufenthalt (3,6 Tage mehr) verursacht (Kyne et al.2001).

In dieser Arbeit wurde ein Real-time-PCR Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung der 16S rRNA von *Clostridium difficile* weiter etabliert. Ein Ziel war, mit Hilfe der Real-time-PCR-Methode die DNA aus Stuhlproben verschiedener Patientengruppen zu untersuchen. Die erste Patientengruppe umfasste dabei Patienten, deren Stuhlproben zuvor im Toxinimmunoassay auf Toxin A und B bereits positiv getestet worden waren. Die zweite Patientengruppe bestand aus Patienten, deren Stuhlproben mit Verdacht auf *Clostridium difficile* in die Mikrobiologische Diagnostik eingesendet wurden, aber im Toxinimmunoassay negativ getestet worden waren. Mit dieser Methode konnte somit eine Aussage sowohl zur Anwesenheit wie auch zur Quantität von *Clostridium difficile* in den untersuchten Stuhlproben gemacht werden. Im Gegensatz zum Toxinimmunoassay wurden auch Patienten mit nicht-Toxin produzierenden *Clostridium difficile* Stämmen detektiert. Anschließend wurde mit Hilfe der konventionellen PCR die DNA der Stuhlproben auf den Nachweis von Toxin A,

Toxin B und das Binary-Toxin hin geprüft und die Ergebnisse mit dem Ergebnis des Toxinimmunoassay verglichen. Der Nachweis des Binary-Toxins ist insofern von Interesse, da das Binary-Toxin mit dem hypervirulenten, 2005 neu aufgetretenen Stamm Nap1/027 in Verbindung gebracht wird.

Ein großes Problem bei der *Clostridium difficile* Infektion (CDI) ist, dass die Sporen lange Zeit in der Umwelt persistieren und auf diesem Wege andere Patienten anstecken können. In dieser Arbeit wurden daher außerdem mit Hilfe des weiteretablierten Real-time-PCR Assays auf 16S rRNA von *Clostridium difficile* Abstriche aus der Umgebung verschiedener Patientengruppen untersucht um eine Aussage über die Kontamination verschiedener Oberflächen und Gegenstände der Patientenumgebung machen zu können.

Es wurden drei Patientengruppen miteinander verglichen: Die erste Gruppe umfasste Patienten die an CDI erkrankt sind. In der zweiten Gruppe waren *Clostridium difficile* negative Patienten, die jedoch mit an CDI Erkrankten auf einer Station lagen. Die dritte Gruppe umfasste *Clostridium difficile* negative Patienten auf Stationen, in denen seit mindestens sechs Monaten kein *Clostridium difficile* mehr nachgewiesen wurde. Außerdem wurde untersucht, inwieweit die gefundenen Keimzahlen der verschiedenen Oberflächen miteinander korrelieren.

3. Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterial

Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,5ml; 1,5ml und 2ml	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Softtubes 0,2ml, einzeln	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf
96 Well Multiply ® PCR Platten	SARSTEDT AG&Co, Nümbrecht
MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip	Applied Biosystems, USA
Optical Caps	Applied Biosystems, USA
Pipettenspitzen, gestopft und ungestopft	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Tip One Extended Length Filter Tips	Starlab GmbH Ahrensburg
Cellstar Einmal Pipette	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettierhilfe „Pipet Boy acu“	Integra Bioscience
Nobaglove®-Latex Handschuhe	NOBA Verbandmittel, Danz GmbH & Co. KG, Wetter
Nobaglove®-Nitril Handschuhe	NOBA Verbandmittel, Danz GmbH & Co. KG, Wetter
Inoculation loops (Einmallösen)	Brand, Wertheim

Gram Kristallviolett	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
Lugol Lösung	BD Heidelberg
Basisches Gram Fuchsin	BD Heidelberg
GasPak™ EZ Anaerobe Container System Anaerobentöpfe	BD Heidelberg Merck Diagnostica, Merck Labor und Chemie Vertrieb GmbH, Darmstadt
Aqua ad injectabilia BRAUN (10ml)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Clostridium difficile Agar with 7% Sheep Blood	BD Heidelberg
Schaedler Agar with Vitamin K and 5% Sheep Blood	BD, Heidelberg
Columbia Agar with 5% Sheep Blood	BD Heidelberg
McConkey Selektiv Agar	BD Heidelberg
DNeasy® Tissue Kit	Quiagen, Hilden
QIAmp® DNA Stool Mini Kit	Quiagen, Hilden
Copan Eswab Collection Kit and Transport System	Copan Italia S.P.A., Brescia, Italia
Crystal Testsystem	BD BBL Crystal ANR ID Kit
Buraton® 10F	Schülke & Mayer GmbH, Norderstedt

Immersionsöl	Kobe, Marburg
Objektträger	Menzel GmbH
Physiologische Kochsalzlösung	
Sterillium pure classic	Bode Chemie, Hamburg
Agarose NEEO Ultraqualität	Roth, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Quiagen, Hilden
100bp Ladder Plus	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNA Ladder Low Range	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
6x Loading Dye Solution	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Quarzküvetten	Hellma, Mühlheim
Präzisionsküvetten	Hellma, Mühlheim

3.2 Laborgeräte

Elektrophoresekammer, horizontal	EC Minicell EC370M Electrophoretic Gel System, Labequip, Markham, Kanada
Pipetten, Eppendorf Research®, variabel	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf Research Pro, 20-300µl	Eppendorf AG, Hamburg

Finnpipette® 10-100µl Thermo	Electrom Corporation
Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
BBL CRYSTAL™ Panel-Betrachter	BD, Sparks, Maryland, USA
Mikroskop	Zeiss
Gene Amp® PCR System 2400	Perkin Elmer, Überlingen
Mastercycler® Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Mini-Schüttler	IKA-Works Inc., Wilmington, USA
LabDancer	IKA-Works Inc., Wilmington, USA
Vortexer MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Biofuge fresco	Heraeus GmbH, Hanau
Biofuge stratos	Heraeus GmbH, Hanau
Mikrowelle	SHARP-Deutschland, Hamburg
Gel-Dokumentationssysteme	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Heraeus GmbH, Hanau
Inkubator (37°C, 5% CO ₂)	Heraeus GmbH, Hanau

Kühlschrank (-4°C)	Liebherr Gastrolino, Biberach
Gefriertruhe (-22°C)	Liebherr Premium, Biberach
Herafreeze Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus GmbH, Hanau
Präzisionswaage	Ohaus Deutschland, Giessen
Feinwaage Explorer®Pro	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA
ABI Prism 7700 Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Digiblock JR	Laboratory Devices Inc., neoLab, Heidelberg
Centrivac	Heraeus GmbH, Hanau
Brutschrank B6	Heraeus, Osterode
Brutschrank B5060	Heraeus, Osterode
Ultraschallgerät Bandelin-Sonorex	Bandelin, Mörfelden

3.3 Bakterienstämme

Für die Untersuchungen wurden Bakterienstämme aus der Stammsammlung und den Routinelabors des Instituts für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene verwendet:

Bacillus cereus (HIM 365-7)

Bacillus subtilis (HIM 367-7)

Clostridium difficile (klinisches Isolat)

Clostridium difficile, Binary-Toxin positiv (H18576)

Clostridium histolyticum (Stammsammlung Marburg 02471)

Clostridium paraputrificum (HIM 542-8)

Clostridium perfringens (HIM 473-4)

Clostridium tetani (HIM 216-1)

Enterococcus faecalis (ATCC 29212)

Enterococcus faecium (ATCC 6657)

Escherichia coli (ATCC 25922)

Proteus mirabilis (ATCC 14153)

Proteus vulgaris (klinisches Isolat)

Staphylococcus aureus (ATCC 29213)

Streptococcus pyogenes (klinisches Isolat)

Der Binary-Toxin-positive *Clostridium difficile* Stamm H18576 war freundlicherweise vom Departement of Clinical Microbiology der Universität Szeged in Ungarn zur Verfügung gestellt worden.

3.4 Bakterienkultur

Die Bakterien wurden unter anaeroben bzw. aeroben Kulturbedingungen auf verschiedenen Kulturmedien angezüchtet. Die Kulturmedien wurden alle als industriell vorgefertigte Agarplatten von der Firma BD (Heidelberg) bezogen.

Columbia-Agar mit 5% Schafblut

Auf Columbia-Agar-Platten mit 5% Schafblut erfolgte die Kultur der grampositiven und gramnegativen aeroben Bakterien. Columbia-Agar ist ein universell einsetzbares Blutagar zur Anzucht verschiedener Bakterien.

Zusammensetzung:

12,0g Casein

5,0g Peptisch abgebautes Tiergewebe

3,0g Hefeextrakt

3,0g Rindfleischextrakt

1,0g Maisstärke
5,0g Natriumchlorid
13,5g Agar
ad 1000ml Aqua dest.

+5% steriles defibriniertes Schafblut

Schaedler-Agar mit Vitamin K₁ und 5% Schafblut

Die Schaedler-Platten wurden zur Kultivierung der anaeroben Bakterienstämme verwendet, so auch zur Anzucht von Clostridien. Das enthaltene Vitamin K₁ wirkt sich fördernd auf das Wachstum von grampositiven sporenbildenden Bakterien aus.

Zusammensetzung:

8,1g Casein
2,5g Peptisch abgebautes Tiergewebe
1,0g Papainisch abgebautes Sojamehl
5,8g Glucose
5,0g Hefeextrakt
1,7g Natriumchlorid
0,8g Dikaliumhydrogenphosphat
0,4g L-Cystin
0,01g Hämin
3,0g Trishydroxymethylaminomethan
13,5g Agar
0,01g Vitamin K₁
ad 1000ml Aqua dest.

+5% steriles defibriniertes Schafblut

Clostridium difficile Selektiv-Nährmedium

Zur Anzucht von *Clostridium difficile* wurde ein spezielles Selektiv-Agar verwendet. Dem Nährmedium wurde Cycloserin und Cefoxitin zur Eindämmung der Begleitflora beigefügt. Cycloserin diente dabei der Selektion der Clostridien im Allgemeinen und Cefoxitin der speziellen Selektion von *Clostridium difficile*.

Zusammensetzung:

40,0g Pepton
6,0g Fructose
2,0g Natriumchlorid
0,1g Magnesiumsulfat
1,0g Kaliumhydrogenphosphat
5,0g Dinatriumhydrogenphosphat
15,0g Agar
0,5g Cycloserin
0,016g Cefoxitin
7% Schafsblut
ad 1000ml Aqua dest.

Die Platten zur Anzucht der Anaerobier wurden vor der Beimpfung mit Bakterien über Nacht unter anaeroben Bedingungen vorreduziert. Zur Reduzierung der Agarplatten und zur Anzucht der anaeroben Bakterien wurden Anaerobentöpfe (Fa. Brand) und GaspaksTM EZ Anaerobe Container System der Firma BD (Heidelberg) verwendet. Bei allen anaeroben Bakterien wurde jeweils auch eine aerobe Kontrollplatte (Columbia Agar mit 5% Schafblut) angelegt.

Sowohl aerob als auch anaerob wachsende Bakterien wurden bei 37°C im Brutschrank für 24-72 Stunden bebrütet.

3.5 Herkunft der Stuhlproben

Es wurden 242 Stuhlproben bearbeitet. Die Stuhlproben wurden vom Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Universitätsklinik Marburg zur Verfügung gestellt und stammten von Patienten mit Diarrhöe und Verdacht auf *Clostridium difficile* der Universitätsklinik Marburg.

3.6 Toxin Immuno Assay

Im Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene wurden alle eingesendeten Stuhlproben mit Verdacht auf *Clostridium difficile* mit einem Enzym-Immuno-Assay (Ridascreen® R-Biopharm, Darmstadt, Germany) auf Toxin A und B getestet. Der Test beruht auf der Bindung von Antikörpern an Toxin-Antigene, die gemessene optische Dichte bei 450nm ist dabei proportional zu den gebundenen Antigenen. Der in der Diagnostik eingesetzte Test weist also Toxin A und B nach. *Clostridium difficile* Stämme die keine Toxine produzieren werden nicht erfasst. Außerdem wird nicht auf das Binary-Toxin getestet.

3.7 Herkunft der Umgebungsproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 531 Abstrichproben von verschiedenen Oberflächen aus der Umgebung von Krankenhauspatienten des Universitätsklinikums Marburg abgenommen.

Die Abstrichproben wurden in drei verschiedene Patientengruppen A, B, und C eingeteilt. Umgebungsproben von Patientengruppe A waren Proben aus der Umgebung von *Clostridium difficile*-positiven Patienten. Gruppe B umfasste Proben aus der Umgebung von *Clostridium difficile*-negativen Patienten, die allerdings mit *Clostridium difficile* positiven Patienten auf einer Station lagen. In Gruppe C wurden die Proben aus der Umgebung *Clostridium difficile*-negativer Patienten eingeteilt von Stationen auf denen seit sechs Monaten kein *Clostridium difficile* mehr nachgewiesen war. Es wurde versucht, in den einzelnen Gruppen eine annähernd gleiche Probenzahl von internistischen wie chirurgischen Stationen abzunehmen. Die Umgebungsproben von Patientengruppe A und B wurden möglichst schnell abgenommen, sobald in der mikrobiologischen Diagnostik das Ergebnis des Enzym Immunoassays bekannt war.

Wichtig war, die Proben vor der Scheuer-Wisch-Desinfektion mit einem sporoziden Reinigungsmittel, die beim Nachweis von *Clostridium difficile* vorgenommen wird, abzunehmen. Die Probennahme erfolgte mit Flocked-Swabs (eSwab®, Copan, Brescia, Italia), einem Nylon- Tupfer, der wie eine weiche Bürste aufgebaut ist und daher besonders viel Material aufnehmen kann (Chernesky et al., 2005) Der Tupfer wurde vor der Probenentnahme einmal in das mitgelieferte Medium eingetaucht, um ihn anzufeuchten. Mit dem Tupfer wurde dann auf einer etwa handtellergroßen Fläche (ca. 10cm x 10cm) 2-3mal gewischt. Der Tupfer wurde gleich nach dem Wischen in das mitgelieferte Röhrchen mit dem Medium gesteckt, um Kontaminationen möglichst zu vermeiden. Bei der Probennahme wurden Handschuhe getragen.

Die Abnahmeorte der Umgebungsproben wurden wiederum in verschiedene Gruppen eingeteilt:

Fußboden des Patientenzimmers

Hände des Patienten

Hände des Personals

Nähere Umgebung des Patienten (<1m)

Entfernte Umgebung des Patienten (>1m)

Die Proben von den Händen der Patienten und des Personals wurden bei Rechtshändern rechts und bei Linkshändern links abgenommen. Die Proben aus der näheren Umgebung umfassten Oberflächen im Abstand von weniger als 1m zum Patienten. Es wurde vorausgesetzt, dass der Patient die meiste Zeit im Bett verbringt. Abnahmeorte der näheren Umgebung waren Bettrahmen, Bettdecke und Kissen, sowie der Tisch (patientenbezogener Nachttisch neben dem Bett). Abnahmeorte der entfernten Umgebung umfassten Proben im Abstand >1m zum Patientenbett. Abnahmestellen waren Möbel, Türgriffe, Lichtschalter, Desinfektionsmittelspender, Waschbecken und Wasserhahn, Toilettenring und Toilettenspülung. Es wurde versucht, möglichst bei jedem Patient eine ähnliche Anzahl von Proben zu entnehmen. Direkt nach der Probennahme wurden die Proben für 20 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt, um die Hülle der Bakteriensporen zu zerstören.

3.8 DNA Extraktion aus Bakterienkulturen

Die genomische DNA der Referenzbakterien aus den Kulturen wurde mithilfe des DNeasy® Tissue Kit (Quiagen, Hilden, Germany) entsprechend den Vorgaben des Herstellers extrahiert.

Dazu wurde zunächst eine Bakteriensuspension mit 1×10^6 Zellen/ml hergestellt und für 10min bei 7500 rpm zentrifugiert. Um die Zellwand zu zerstören wurde bei den grampositiven Bakterien das Pellet in 180 µl Lysis-Puffer gelöst und 30min inkubiert. Danach wurde 25µl Proteinase K und 200µl AL-Puffer hinzugefügt und bei 70°C 30min inkubiert. Bei den gramnegativen Bakterien wurde das Pellet in 180µl ATL-Puffer gelöst, es wurde 20µl Proteinase K hinzugefügt und bei 55°C über Nacht inkubiert. Danach wurde 200µl AL-Puffer dazugegeben und bei 70°C für 10min inkubiert.

Die nächsten Arbeitsschritte zur DNA-Isolierung waren für die grampositiven und die gramnegativen Bakterien gleich. Die Bakterienlysate wurden mit 100% Ethanol versetzt und auf eine DNeasy Mini Spin Column geladen. Die DNeasy Mini Spin Column enthält eine Membran auf der die in Ethanol gelöste DNA bindet. Um das Ethanol auszuwaschen folgten zwei Waschschrte mit 500µl AW1-Puffer und 500µl AW2-Puffer. Anschließend wurde die DNA in 50µl Aqua dest. eluiert.

Zusammensetzung des Lysis-Puffers:

20mM Tris Cl, pH 8,0

2mM Sodium EDTA

1,2% Triton®X-100

20mg/ml Lysozym

(Alle Fa. Sigma)

3.9 DNA-Extraktion aus Stuhlproben

Die DNA Extraktion aus den Stuhlproben erfolgte mit dem QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany), ebenfalls entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Es wurde das Protokoll „Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection“ verwendet. Dazu wurden 180-220mg Stuhl mit einer Präzisionswaage

(Fa. Ohaus) abgewogen, mit 1,4ml Puffer ASL versetzt, gevortex und 5 min bei 70°C zur Lyse der Bakterien inkubiert. Nach Abzentrifugieren grober Stuhlpartikel wurde in 1,2ml des Überstandes eine InhibitEX-Tablette gegeben und gevortex. Nach Zentrifugieren wurden 200µl des Überstandes mit 15µl Proteinease K und 200µl Puffer AL versetzt und 10min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Ethanol wurde alles zusammen in eine QUIamp Spin Column gegeben und zentrifugiert. Die DNA wurde dabei in einer Membran aufgefangen. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500µl Puffer AW1 und AW2, danach wurde die DNA in 50µl Aqua dest. eluiert.

3.10 DNA-Extraktion aus Umgebungsproben

Die DNA Extraktion aus den Umgebungsproben erfolgte mit der Phenol-Chloroform Methode. Die zuvor 20 min im Ultraschallbad vorbehandelten Proben wurden zunächst bei 8000rpm 10min zentrifugiert. Das Pellet wurde zur Auftrennung der Proteine in 500µl Verdauopuffer und 5µl Protein Kinase K gelöst und über Nacht im Heizblock bei 50°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 500µl Phenol (Roti®-Phenol, ROTH, Karlsruhe) hinzugefügt, gevortex und bei 13000rpm 2min zentrifugiert. Es bilden sich nun 3 Phasen: eine untere lipophile Phase, eine obere wässrige Phase und dazwischen die Interphase. Aufgrund ihres hydrophilen Charakters sammeln sich die Nukleinsäuren in der oberen wässrigen Phase. Denaturierte Proteine und Verunreinigungen sammeln sich in der Interphase. Der wässrige Überstand mit den Nukleinsäuren wurde nun vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß pipetiert und mit 250µl Phenol und 250µl Chloroform/Isoamylalkohol(24:1) versetzt. Dann wurde die Probe wieder gevortex und 2min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und es wurden 500µl Chloroform/Isoamylalkohol hinzugefügt. Die Mischung wurde wieder gevortex und bei 13000rpm zentrifugiert. Nun wurde der Überstand genau abgemessen und zur DNA-Fällung mit 0,1Vol Na-Acetatlösung und 2,5Vol eiskaltem 100% Ethanol versetzt. Die Mischung wurde gut geschüttelt und über Nacht bei -70°C gekühlt. Im nächsten Schritt wurde die Probe bei 4°C bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dem Pellet wurde 1ml eiskaltes 70% Ethanol hinzugefügt. Die Mischung wurde nun für eine Stunde bei -70°C gekühlt und dann bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet dann in 50µl Aqua dest. eluiert

Zusammensetzung des Verdau-Puffers:

100mM NaCl

10mM Tris-Cl (pH8,0)

25mM EDTA (pH8,0)

0,5% SDS

0,1mg/ml Proteinase K

(Alle Fa. Sigma)

3.11 Konventionelle PCR

Zum qualitativen Nachweis der Gene von Toxin A, Toxin B und des Binary-Toxins aus der DNA der Stuhlproben wurde eine konventionelle PCR (Polymerase-Chain-Reaction) verwendet. Die konventionelle PCR dient der exponentiellen Amplifizierung eines bestimmten DNA-Abschnitts (Mullis et al., 1986) Dies geschieht mit Hilfe einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), die einen komplementären Strang zu einem bestimmten Abschnitt der Ziel-DNA synthetisiert. Voraussetzung ist die Kenntnis der Nukleotidsequenz am Anfang und am Ende des Abschnitts der Ziel-DNA, da an diesen Sequenzen die Primer (forward-Primer und reverse-Primer) binden. Ein PCR-Zyklus umfasst drei Phasen. Zu Beginn wird die DNA bei über 90°C denaturiert, die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen werden zerstört, so dass nun DNA Einzelstränge vorliegen. Es folgt die Annealing-Phase, in der die Primer an die Einzelstrang-DNA binden. Dazu wird die Temperatur entsprechend den Temperatur-Optima der Primer auf 50°C gesenkt. Anschließend folgt die Elongations-Phase bei 72°C in der die thermostabile DNA-Polymerase vom 3'-Ende des forward-Primers einen komplementären Strang zum Ziel-DNA-Einzelstrang synthetisiert. Der PCR-Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird nun circa 30mal wiederholt. Da die amplifizierten DNA-Stränge in den nächsten Zyklen ebenfalls als Matrize zur Verfügung stehen, kommt es zum exponentiellen Anstieg der amplifizierten Sequenz. Das amplifizierte Produkt der PCR wird anschließend mit Hilfe der Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht.

3.12 Real-time-PCR

Zur Quantifizierung wurde sowohl die extrahierte DNA aus den Umgebungsproben als auch die DNA aus den Stuhlproben mit Hilfe eines Real-time-PCR Assays auf das 16S-rRNA-Gen hin untersucht. Es wurden für jede Probe Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Real-time-PCR Methode kann mit einem PCR-Lauf sowohl zum Nachweis von *Clostridium difficile* als auch zur Quantität von *Clostridium difficile* in der untersuchten Probe eine Aussage machen. Bei der Real-time-PCR wird eine Fluoreszenz-markierte Hybridisierungssonde verwendet, die zwischen den eingesetzten Primern an den komplementären Einzelstrang der Ziel-DNA bindet. Die Hybridisierungssonde trägt am 5' Ende den so genannten Reporter und am 3' Ende einen so genannten Quencher. Um eine Primeraktivität zu verhindern ist das 3' Ende mit einem Phosphatrest blockiert.

Wird nun der Reporter durch Laserlicht (488nm) angeregt, so kommt es zu einem Fluoreszenzanstieg des Reporters, der aber durch den Quencher unterdrückt wird.

Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet und funktioniert nur so lange Reporter und Quencher nah beieinander liegen. Werden Reporter und Quencher getrennt, kann die Fluoreszenz des Reporters gemessen werden.

In dieser Studie wurden TaqMan-Sonden verwendet. Bei dem TaqMan-Prinzip verbindet sich die Hybridisierungssonde mit dem komplementären DNA-Strang zwischen den Bindungsstellen der Primer. Diese Methode nutzt den Umstand, dass die Taq-Polymerase nicht nur eine Polymerase-Aktivität, sondern auch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität hat. Bei der Synthese des neuen DNA-Strangs zerschneidet die Taq-Polymerase die Hybridisierungssonde und Reporter und Quencher werden voneinander getrennt. Die Energie des angeregten Reporters wird nun nicht mehr vom Quencher unterdrückt und kann als Fluoreszenz-Zunahme gemessen werden.

Da die Taq-Polymerase ihre 5'-3'-Exonuklease-Aktivität nur am DNA-Doppelstrang entwickelt, ist gesichert, dass die nicht gebundenen Sonden das Fluoreszenzsignal nicht verfälschen. Die gemessene Fluoreszenz-Zunahme ist proportional zur synthetisierten Produktmenge und wird während der PCR durch den geschlossenen Deckel des Reaktionsgefäßes gemessen. Die Auswertung der Fluoreszenz-Signale geschieht am Computer über Berechnung von Fluoreszenz-Schwellenwerten (Threshold) aus der Hintergrund-Fluoreszenz in den ersten PCR-Zyklen, wenn erst sehr wenig Produkt gebildet wird. Als Ct-Wert wird der Schwellenwert-Zyklus bezeichnet, in dem eine

signifikante Fluoreszenzzunahme über der Hintergrundfluoreszenz registriert wird. Anhand der Ct-Werte bekannter DNA-Standard-Proben kann nun eine Standardkurve berechnet werden, über die dann unbekannte Proben quantifiziert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Real-time-PCR-Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung der 16S rRNA Gene von *Clostridium difficile* weiteretabliert werden. Dazu wurden zur Überprüfung der Spezifität der Real-time-PCR noch einmal 15 verschiedene Bakterienstämme mit dem Real-time-PCR Assay untersucht. Eine Standardkurve zum Vergleich der Ct-Werte lag bereits vor.

3.13 Konventionelle PCR Primer und Real-time-PCR Primer und Sonde

Primer und Sonde	Nukleotidsequenz 5'-3'	Fragmentlänge	Referenz
<i>Clostridium difficile</i>			
16S rRNA		157bp	
Forward	TTGAGCGATTTACTTCGGTAAAGA		*
Reverse	CCATCCTGTACTGGCTCACCT		*
Sonde	6-Fam- CGGCGGACGGGTGAGTAACG		
Toxin A (tcdA)		602bp	
Forward	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGG		**
Reverse	GAGTAACTTCCTGCTCCATCAA		**
Toxin B (tcdB)		101bp	
Forward	ATATCAGAGACTGATGAG		***
Reverse	TAGCATATTCAGAGAGAATATTGT		***
Binary Toxin (cdtA, cdtB)			
Forward cdtA	TGAACCTGGAAAAGGTGATG	375bp	****
Reverse cdtA	AGGATTATTTACTGGACCATTG		****
Forward cdtB	CTTAATGCAAGTAAATACTGAG	510bp	****
Reverse cdtB	AACGGATCTCTTGCTTCAGTC		****

*Rinttilä et al., 2004

**Cohen et al., 2000

***Belanger et al., 2003

****Terhes et al., 2004

3.14 Cyclex-Programme und Master Mix-Ansätze von Real-time-PCR und konventioneller PCR

Master Mix-Ansatz für die Real-time-PCR, 25µl

Bestandteil	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
Ready Mix (SIGMA)	12,5µl	
MgCL ₂ *	2,5µl	2,5mM
Reference Dye*	0,5µl	
Forward Primer (50µM)	0,25µl	0,5µM
Reverse Primer (50µM)	0,25µl	0,5µM
TaqMan Sonde (10µM)	0,375µl	0,15µM
DNA Template	2,5µl	
H ₂ O	ad 25µl	

*JumpStartTMTaq ReadyMixTM with dUTP, Sigma Aldrich, Steinheim

Cyclex-Programm der Real-time-PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Aktivierung	50	2min	1
Initiale Denaturierung	95	10min	1
Denaturierung	95	15sec	} 40
Annealing	60	1min	

Master Mix-Ansatz für die konventionelle PCR, 25µl

-Toxin A-*

Bestandteil	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
10x Puffer**	2,5µl	
MgCL ₂	2µl	2mM
dNTP Mix (10mM)***	1µl	0,4mM
Forward Primer	0,5µl	1µM

Reverse Primer	0,5µl	1µM
Taq-Polymerase (5U/µl)****	0,3µl	0,06U
DNA-Template	5µl	
H ₂ O	ad 25µl	

**Cohen et al., 2000, modifiziert*

***Zusammensetzung: 20mM Tris-HCL pH 8,0; 100mM KCL; 0,1mM EDTA; 1mM DDT; 50% Glyzerol; 0,5% Tween®20; 0,5% lepal®CA630; Eppendorf AG, Hamburg)*

***** Eppendorf AG, Hamburg*

****Taq DNA PolymerasePCR Kit, Eppendorf AG, Hamburg*

Cycler-Programm der konventionellen PCR

–Toxin A-*

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95°C	30sec	40
Annealing	55°C	30sec	
Extension	72°C	30sec	

**Cohen et al., 2000*

Master Mix-Ansatz für die konventionelle PCR, 25µl

-Toxin B-*

Bestandteil	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
10x Puffer**	2,5µl	
MgCl ₂	1µl	1mM
dNTP Mix (10mM)***	1µl	0,4mM
Forward Primer	1µl	2µM
Reverse Primer	1µl	2µM
Taq-Polymerase(5U/µl)****	0,2µ	0,04U
DNA-Template	2,5µl	
H ₂ O	ad 25µl	

**Belanger et al., 2003*

***Zusammensetzung: 20mM Tris-HCL pH 8,0; 100mM KCL; 0,1mM EDTA; 1mM DDT; 50% Glyzerol; 0,5% Tween®20; 0,5% lepal®CA630; Eppendorf AG, Hamburg)*

*** *Eppendorf AG, Hamburg*

**** *Taq DNA Polymerase PCR Kit, Eppendorf AG, Hamburg*

Cycler-Programm der konventionellen PCR

–Toxin B-*

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	3min	1
Denaturierung	94°C	10sec	45
Annealing	50°C	15sec	
Extension	72°C	7sec	

**Belanger et al., 2003*

Master Mix-Ansatz für die konventionelle PCR, 20µl

-Binary-Toxin-*

Bestandteil	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
10x Puffer**	2µl	
MgCl ₂	2,5µl	3mM
dNTP Mix (10mM)***	0,4µl	0,2mM
Forward Primer	0,06µl	0,15mM
Reverse Primer	0,06µl	0,15mM
Taq-Polymerase (5 U/µl)****	0,06µl	0,02U
DNA-Template	2,5µl	
H ₂ O	ad 20µl	

**Terhes et al., 2004, modifiziert*

***Zusammensetzung: 20mM Tris-HCL pH 8,0; 100mM KCL; 0,1mM EDTA; 1mM DDT; 50% Glyzerol; 0,5% Tween®20; 0,5% lepal®CA630; Eppendorf AG, Hamburg*

*** *Eppendorf AG, Hamburg*

**** *Taq DNA Polymerase PCR Kit, Eppendorf AG, Hamburg*

Cycler-Programm der konventionellen PCR

–Binary-Toxin-*

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	94°C	45sec	30
Annealing	52°C	1min	
Extension	72°C	2min	

*Terhes et al., 2004

3.14 Gel- Elektrophorese

Das amplifizierte Produkt aus der konventionellen PCR für Toxin A, Toxin B und Binary-Toxin wurde mit Hilfe der Gel-Elektrophorese nachgewiesen.

Für die Gel-Elektrophorese von Toxin A und Binary-Toxin wurde ein 1,2% Agarosegel verwendet. Für die Elektrophorese von Toxin B wurde ein 2% Agarosegel eingesetzt, da das Produkt aus der PCR auf Toxin B mit 101bp sehr klein war. Zur Herstellung des Gels wurde entsprechend der gewünschten Konzentration Agarosepulver (Agarose NEEO ROTI®AGAROSE, Roth, Karlsruhe) in TAE-Laufpuffer gelöst, dreimal kurz aufgekocht, in den Gelschlitten mit dem Kamm gegossen und abgekühlt.

Nach Verfestigung des Gels wurden die durch den Kamm geformten Taschen mit 10µl PCR-Produkt und 4µl Loading Dye beladen. Die Loading Dye bewirkt, dass die PCR-Proben absinken und nicht in den Laufpuffer diffundieren, außerdem kann über einen Farbstoff die Wanderungsstrecke der DNA verfolgt werden. Je nach Fragmentgröße wurden unterschiedliche Molekulargewichtsmarker eingesetzt. Bei einer angelegten Spannung von 90V wurden die DNA-Fragmente in einer Minicell EC370M Gelelektrophoresekammer (Fa.Labequip) aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele im Ethidiumbromid-Bad (0,5µg/ml 3,8 Diamino-6-ethyl-5-phenylanthridiniumbromid in Wasser) 30 min gefärbt und 30 min zu Kontrastverstärkung im Wasserbad entfärbt. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen einzelnen Basenpaare der Doppelstrang-DNA. Unter UV-Licht emittiert das interkalierte Ethidiumbromid dann Licht bei 590nm wodurch auch sehr geringe DNA-Mengen nachgewiesen werden können.

Zusammensetzung der 6x-Loading-Dye:

0,03% Bromphenolblau

0,03%Xylene cyanol FF

60% Glycerol

1% SDS

100mM EDTA (pH 7,6)

Zusammensetzung des TAE-Laufpuffers:

4,84g Tris-Base

1,14ml Essigsäure

2ml 0,5M EDTA (pH 8,0)

ad 1000ml H₂O, bidest.

3.15 Statistische Analyse der Stuhlproben

Für die Stuhlproben wurden zunächst entsprechend dem ELISA-Testergebnis der Median und die Quartilabstände berechnet. Zur Bestimmung des Medians wurden die Werte nach der Größe geordnet, der Wert in der Mitte entsprach dem Median. Durch Halbierung der gleichgroßen Teilmengen über und unter dem Median ergab sich die 25% und 75% Quartile, das 50% Quartil ist der Median. Der Median hat im Vergleich zum arithmetischen Mittel den Vorteil, dass er von Ausreißern weniger stark beeinflusst wird. Um die Bakterienzahlen der im ELISA-Test negativen Proben und der im ELISA-Test positiven Proben zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-Rangsummen-Test durchgeführt. Das gewählte Signifikanzniveau in dieser Studie war 5% ($p=0,05$). Die Real-Time-PCR Werte der Stuhlproben wurden in Quintilen eingeteilt: $<10^2$; $\geq 10^2$ und $<10^4$; $\geq 10^4$ und $<10^6$; $\geq 10^6$ und $<10^7$; $\geq 10^7$ Zellen/ml.

Um die Genauigkeit der Realtime-PCR zu prüfen wurde über die Spezifität und Sensitivität eine ROC-Kurve (Receiver-Operating-Characteristic) sowie die AUC (area under the curve) berechnet.

3.16 Statistische Analyse der Umgebungsproben

Zur statistischen Analyse wurden zunächst von den unterschiedlichen Oberflächen der drei verschiedenen Patientengruppen das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Es wurde der Waldtest durchgeführt und als Level der statistischen Signifikanz 5% ($p=0,05$) gewählt. Um mögliche Zusammenhänge und die Stärke der Zusammenhänge zwischen den einzelnen Proben-Gruppen nachzuweisen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Zur Quantifizierung der Stärke des Zusammenhangs wurde der Spearman Korrelationskoeffizient (r) verwendet: Ein positives r steht für einen gleichsinnigen Zusammenhang, ein negatives r für einen gegensinnigen Zusammenhang. Je näher r an 1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang, je näher r an 0 liegt desto schwächer ist der Zusammenhang. Ein $r>0,7$ bezeichnet einen hoch signifikanten Zusammenhang.

Um Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Probengruppen zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet. Aufgabe der Regressionsanalyse ist es, eine Gleichung für eine Gerade herzuleiten, mit der man den Zusammenhang zwischen zwei quantitativen Merkmalen so beschreiben kann, dass sich aus einem bekannten Wert für die Variable X (unabhängige Variable) der Wert einer anderen Variable Y (abhängige Variable) prognostizieren lässt. Multiple lineare Regression bedeutet, dass eine abhängige Variable Y von mehreren unabhängigen Variablen X beeinflusst wird, wodurch die Y-Werte variieren. R^2 ist dabei das Bestimmtheitsmaß, welches die Variabilität der abhängigen Variablen Y beschreibt. Mit R^2 ist ein p-Wert verknüpft, mit dem die Nullhypothese getestet wird (Nullhypothese: Keine der unabhängigen Variablen hat einen signifikanten Einfluss auf Y).

4. Ergebnisse

In der Arbeit wurden zwei Fragestellungen zum Nachweis und zur Quantifizierung von *Clostridium difficile* untersucht. Die erste Studie beschäftigt sich mit dem Nachweis und der Quantifizierung von *Clostridium difficile* aus Stuhlproben von Krankenhauspatienten. In diesem Teil wurden als indirekter Nachweis die Stuhlproben zudem auf Toxin A, B und das Binary-Toxin hin untersucht. In der zweiten Studie wurde nach einer Nachweismöglichkeit und der Quantifizierung von *Clostridium difficile* aus Umgebungsproben von Krankenhauspatienten gesucht.

4.1 Sensitivitäts- und Spezifitätsprüfung der Real-time-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Real-time-PCR Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung der Gene der 16S rRNA von *Clostridium difficile* weiter etabliert.

Freundlicherweise konnte dabei teilweise auf die Arbeiten der Diplombiologin Regina Kropatsch zum Thema „*Clostridium difficile*-assoziierte Erkrankung: Etablierung einer 16SrRNA-spezifischen Real-Time-PCR zum quantitativen Nachweis“ zurückgegriffen werden. Eine Standardkurve mit 10 fach Verdünnungen von *Clostridium difficile*-Lysat aus bakterieller Reinkultur war bereits berechnet worden.

Um die Spezifität von Primern und Sonde des verwendeten Real-time-PCR Assays zu prüfen, wurden die Reinkulturen von 15 verschiedene Bakterien (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium difficile*, *Clostridium difficile* (Binary positiv)) mit der Real-time-PCR amplifiziert. Zur Spezifitätsprüfung wurden einmal hitzeinaktivierte Bakterienlysate der oben genannten Bakterien mit 10^6 CFU/ml verwendet, sowie extrahierte DNA aus 10^6 CFU/ml. Die hitzeinaktivierten Bakterienlysate mit 10^6 CFU/ml reagierten in der Real-time-PCR mit Ausnahme des Bakterienlysats aus *Clostridium difficile* alle negativ.

Die extrahierten DNA-Proben aus 10^6 CFU/ml der Referenzbakterien waren außer einer DNA-Probe von *Clostridium perfringens* und der DNA-Probe von *Clostridium difficile* ebenfalls alle negativ, es wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet. Die Nachweisgrenze des verwendeten Real-time-PCR Assays lag bei 1×10^2 Zellen/ml, was 4×10^4 Zellen/g

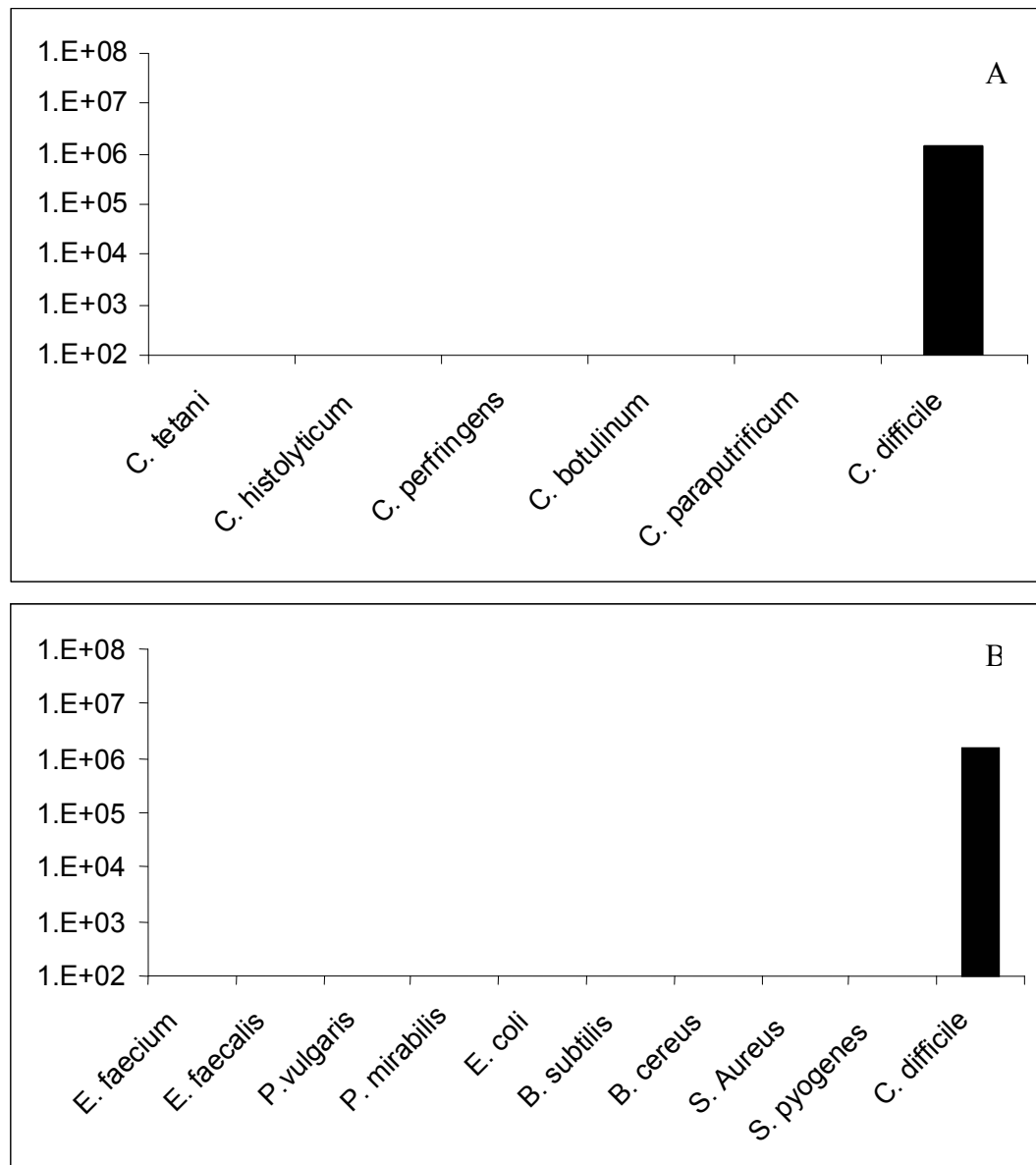
Stuhl entspricht. Somit wurde ein Detektionsbereich über 6 logarithmische Stufen von 10^8 bis 10^2 CFU/ml erreicht. Auf die Stuhl- und Umgebungsproben bezogen konnten also alle Proben mit mindestens 1×10^2 Zellen/ml bzw. 4×10^4 Zellen/g Stuhl als positiv gerechnet werden.

Abb.1:

Spezifität von Primer und Sonde zum Nachweis der 16S rRNA von *Clostridium difficile* mittels Real-time-PCR.

A: Testung verschiedener Clostridium Spezies, B: Vergleichstestung potentieller Darmbakterien

Es wurden jeweils Äquivalente von 10^6 Bakterienzellen getestet



4.2 Untersuchung der Stuhlproben

4.2.1 Vergleich der Ergebnisse des Toxinnachweises mittels ELISA mit dem Nachweis und der Quantifizierung mittels Real-time-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 242 Stuhlproben mit einem Real-time-PCR Assay auf den Nachweis und die Zellzahl von *Clostridium difficile* hin untersucht. Die Real-time-PCR basierte auf dem Nachweis der 16S rRNA von *Clostridium difficile*. Die Stuhlproben stammten von Patienten des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg mit Verdacht auf eine *Clostridium difficile* assoziierte Erkrankung. Die eingeschickten Stuhlproben wurden in der Mikrobiologischen Diagnostik mit einem Toxin-ELISA auf Toxin A und Toxin B hin untersucht. Im Anschluss wurde direkt aus den Stuhlproben die DNA extrahiert und die extrahierte DNA-Probe mittels Real-time-PCR auf die 16S rRNA von *Clostridium difficile* getestet. Jede Probe wurde mit Hilfe einer konventionellen PCR auf die Anwesenheit von Toxin A, Toxin B und das Binary-Toxin hin überprüft.

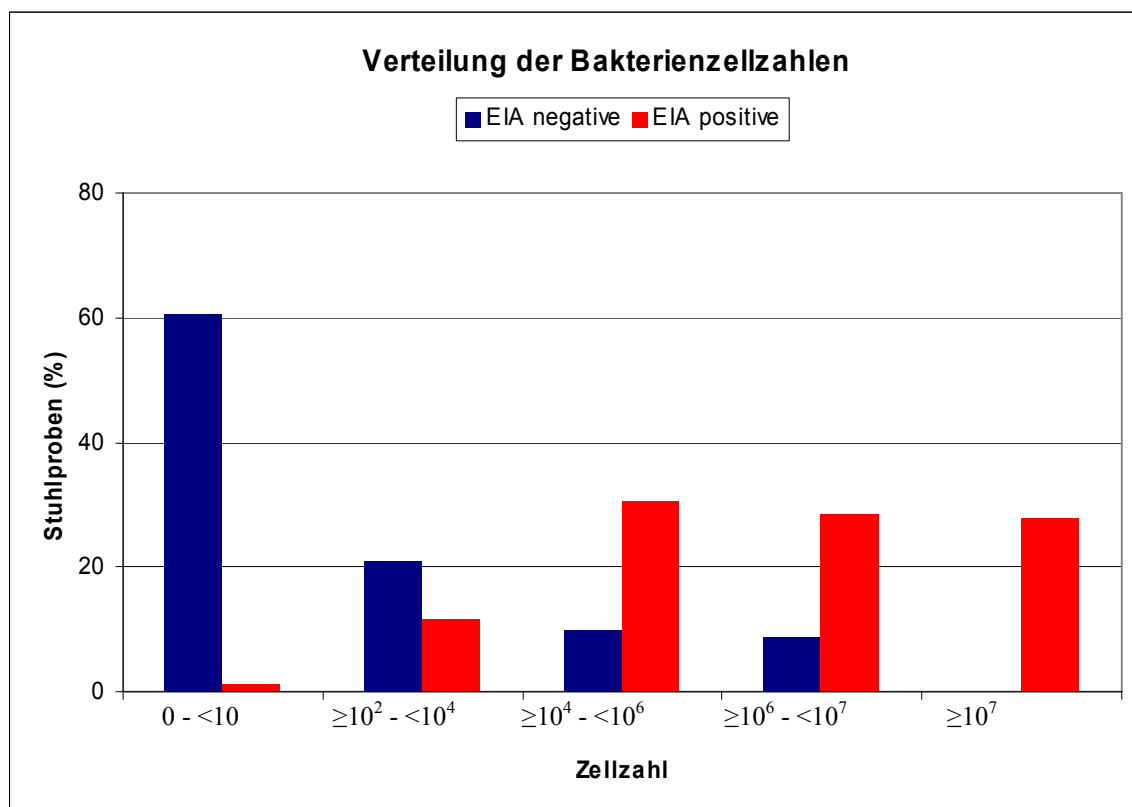
Tab.1: Ergebnisse des ELISA, der Real-time-PCR und der Toxintestung mittels konventioneller PCR

	Total
	n (%)
ELISA Test	
Negative	81 (33.5)
Positive	161 (66.5)
Bakterienzahlen	
$0 - <10^2$	51 (21.1)
$\geq 10^2 - <10^4$	36 (14.9)
$\geq 10^4 - <10^6$	57 (23.5)
$\geq 10^6 - <10^7$	53 (21.9)
$\geq 10^7$	45 (18.6)
Toxine	
A+ and B+	108 (44.6)
A+ and B-	5 (2.1)
A- and B+	38 (15.7)
A- and B-	91 (37.6)
Binary toxin +	10 (4.1)
Total	242 (100.0)

Bei 161 (66,5%) der 242 Stuhlproben bestätigte sich der Verdacht auf *Clostridium difficile* im Toxinnachweis mittels ELISA. Die restlichen 81 (33,5%) Stuhlproben waren im Toxinnachweis mittels ELISA negativ. Bei einer Nachweisgrenze der Real-time-PCR bei 4×10^4 Zellen/g Stuhl konnten 191 (78,9%) Proben mittels Real-time-PCR als positiv identifiziert werden.

Von den 161 im Toxinnachweis mittels ELISA positiv getesteten Stuhlproben waren in der Real-time-PCR 157 (98,1%) Proben ebenfalls mit mehr als 10^2 Zellen/ml positiv, während nur 3 Proben (1,9%) mit weniger als 10^2 Zellen/ml in der Real-time-PCR negativ getestet wurden. Von den 81 im Toxinnachweis mittels ELISA negativ getesteten Stuhlproben waren in der Real-time-PCR 32 (39,5%) Proben positiv und 49 (60,5%) negativ. Es zeigte sich, dass die im ELISA positiv getesteten Stuhlproben auch in der Real-time-PCR häufiger positiv getestet wurden. Aus der Verteilung der Zellzahlen/ml wird ersichtlich, dass die im ELISA positiv getesteten Stuhlproben signifikant höhere Zellzahlen aufwiesen als die im ELISA negativ getesteten Proben (Abbildung 2, Tab.2). Die Wahrscheinlichkeit, dass im ELISA positiv getestete Proben Zellzahlen zwischen 10^6 und 10^7 Zellen/ml hatten, war zwischen 5,1 und 6,5 mal größer als bei Proben, die im ELISA negativ getestet worden waren.

Abb.2: Verteilung der Zellzahlen in Bezug zum Ergebnis des ELISAs



Tab.2: Median und Perzentilen ($\times 10^3$) von *Clostridium difficile* in ELISA negativen und positiven Proben

	ELISA negativ		ELISA positiv		p-Wert
	Median	25-75%	Median	25-75%	
Stuhlprobe in Gramm	27,3	27,3 – 572,0	822,00000	37,60000 – 5,140,00000	<0,001
Stuhlprobe in CFU/ml	0,07	0,07 – 2,23	1,89234	69,26 – 12,40000	<0,001

- MannWhitney Rang Summen Test

4.2.2 Sensitivität und Spezifität der Real-time-PCR in Bezug auf Stuhlproben

Als Goldstandart in der Diagnostik auf *Clostridium difficile* wird allgemein der Nachweis der Toxizität in der Zellkultur angesehen. Da dieser Test in der Mikrobiologischen Diagnostik in Marburg jedoch nicht zum Routineverfahren gehört und nicht zur Verfügung stand, wurde die Sensitivität und Spezifität der Real-time-PCR in Bezug auf Stuhlproben im Vergleich zum Ergebnis im Toxinnachweis mittels ELISA errechnet. Es konnte gezeigt werden, dass mit steigenden Zellzahlen/ml die Sensitivität sank, während bei einem niedrigen cut-off von $>10^2$ Zellen/ml die Sensitivität fast 99% betrug (Tabelle 3). Die Spezifität nahm dagegen mit steigenden Zellzahlen/ml zu, wobei allerdings auch bei niedrigen Zellzahl- Levels die Spezifität noch relativ hoch lag, so lag die Spezifität bei $>10^2$ Zellen/ml immerhin bei 60%. Außerdem lässt sich aus Tabelle 3 ablesen, dass der höchste Prozentsatz an korrekt getesteten Proben bei den Stuhlproben mit fast 86% bei einem cut-off von $>10^2$ Zellen/ml lag.

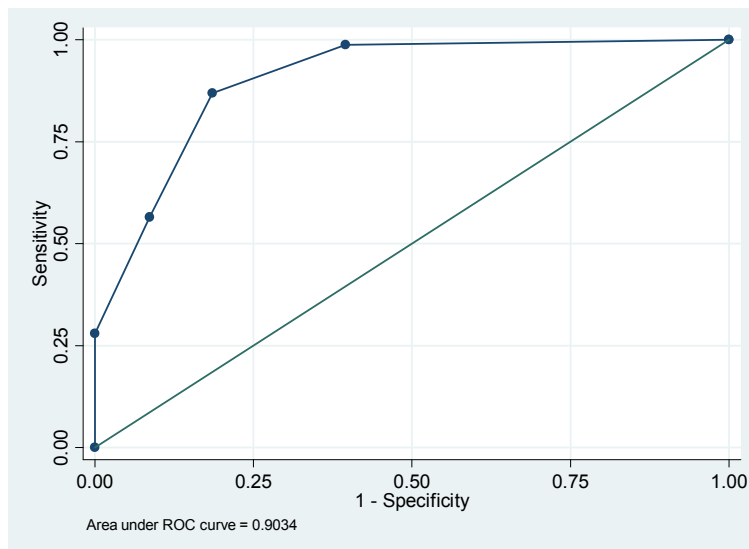
Tab. 3: Real-time-PCR. Ergebnisse für unterschiedliche cut-offs von *Clostridium difficile* Zellzahlen

<i>C. difficile</i> Zellzahlen/ml	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Korrekt klassifizierte Proben	Positive Likelihood Ratio
≥ 0	100.00	0.00	66.53	1.00
$\geq 10^2$	98.76	60.49	85.95	2.50
$\geq 10^4$	86.96	81.48	85.12	4.70
$\geq 10^6$	56.52	91.36	68.18	6.54
$\geq 10^7$	27.95	100.00	52.07	-
$> 10^7$	0.00	100.00	33.47	-

Um die Genauigkeit der Real-time-PCR zu überprüfen, wurde anhand der Sensitivität und Spezifität eine ROC-Kurve erstellt. Die Fläche unter der ROC-Kurve betrug dabei 0,90 bei einem 95% Konfidenzintervall von 0,86-0,94 (s. Abbildung 3).

Aus der ROC-Kurve und Tabelle 3 ergab sich die beste Kombination von Spezifität und Sensitivität bei einem Schwellenwert von 10^4 Zellen/ml, wobei hier eine Spezifität von fast 82% und eine Sensitivität von fast 87% erreicht wurde.

Abb.3 ROC Kurve für die Quintilen der *C. difficile* Zellzahlen, gemessen mittels Real-time-PCR



4.2.3 Nachweis von Toxin A, Toxin B und Binary-Toxin in Stuhlproben

Nachdem mit der Real-time-PCR über die 16S rRNA-Gene eine Aussage über den Nachweis und die Zellzahl von *Clostridium difficile* in den Stuhlproben vorlag, wurden alle 242 Stuhlproben mit einem konventionellen PCR-Protokoll noch auf die Anwesenheit der Gene für Toxin A und Toxin B hin untersucht. Dabei wurde auf bereits veröffentlichte Primersequenzen aus Studien (Bélanger et al., 2003; Cohen et al., 2000) zurückgegriffen.

Einen Überblick über den Nachweis von Toxin A und Toxin B bei allen Stuhlproben liefert Tabelle 2. Insgesamt konnten bei den meisten Stuhlproben entweder beide Gene für Toxin A (tcdA) und Toxin B (tcdB) nachgewiesen werden oder weder das Gen für

Toxin A noch das Gen für Toxin B. So konnten insgesamt bei 108 (44,6%) Proben beide Gene *tcdA* und *tcdB* nachgewiesen werden und bei 91 (37,6%) Proben keines der beiden Gene *tcdA* und *tcdB*.

Von allen Proben wurden 5 (2,1%) Proben positiv auf das *tcdA* Gen aber negativ auf das *tcdB* Gen getestet, während bei 38 (15,7%) Proben nur das Gen für Toxin B aber nicht das Gen für Toxin A nachgewiesen werden konnte. Betrachtet man den Nachweis von Toxin A und B getrennt in im ELISA positiv und negativ getestete Proben, fällt auf, dass die Proben, die beim Toxinnachweis mittels ELISA positiv waren, auch in der PCR vermehrt für mindestens eines der Gene von Toxin A und Toxin B positiv waren ($p < 0,001$) (Tabelle 4).

Bei den im ELISA positiv getesteten Proben waren 104 (43,0%) Proben sowohl für Toxin A als auch für Toxin B positiv, bei den im ELISA negativ getesteten Proben waren nur 4 (1,6%) Proben für die Gene von Toxin A und B positiv. Im Gegensatz dazu waren bei den im ELISA positiven Proben nur 19 (11,8%) Proben sowohl für das Gen von Toxin A als auch das Gen für Toxin B negativ. Unter den Proben, die im Toxinnachweis mittels ELISA negativ getesteten waren dagegen 72 (88,8%) Proben sowohl für das Gen von Toxin A als auch für das Gen von Toxin B negativ. Bei den im ELISA positiv getesteten Proben waren 5 (3,1%) Proben positiv für Toxin A und negativ für Toxin B, sowie 33 (20,5%) Proben negativ für Toxin A aber positiv für Toxin B. Unter den im ELISA negativ getesteten Proben waren 5 (2,1%) Proben negativ für Toxin A und positiv für Toxin B. Ein Stamm der Toxin A positiv aber Toxin B negativ war, konnte unter den im ELISA negativen Proben nicht nachgewiesen werden.

Tab.4: Verteilung von Toxin A und Toxin B in Bezug zum ELISA Test

	Toxine				Total n (%)
	A+ and B+ n (%)	A+ and B- n (%)	A- and B+ n (%)	A- and B- n (%)	
ELISA-	4 (1.65)	0 (0.00)	5 (2.07)	72 (29.75)	81 (33.47)
ELISA+	104 (42.98)	5 (2.07)	33 (13.64)	19 (7.85)	161 (66.53)
Total	108 (44.63)	5 (2.07)	38 (15.70)	91 (37.60)	242 (100.00)

Fischer's exact test – $p < 0.0001$

Im Rahmen dieser Arbeit sollte außerdem untersucht werden, ob bei den getesteten Stuhlproben auch das außerhalb vom PaLoc gelegene Gen des Binary-Toxins nachgewiesen werden kann. Dazu wurden alle Stuhlproben über zwei konventionelle

PCR-Protokolle auf die Gene *cdtA* und *cdtB* hin untersucht. Die Primer und Cyclerprogramme waren einer Veröffentlichung (Terhes et al., 2004) entnommen worden. Es zeigte sich, dass insgesamt 10 (4,1%) Stuhlproben positiv für die Gene *cdtA* und *cdtB* waren. Bei 9 von den 10 Proben konnten außerdem die Gene für Toxin A und Toxin B identifiziert werden während bei einer Probe nur das Gen für Toxin A aber nicht das Gen für Toxin B nachgewiesen werden konnte.

Von den Binary-Toxin positiven Proben waren 9 Proben im Toxinnachweis mittels ELISA positiv und eine Probe im ELISA negativ getestet worden.

4.2.4 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Insgesamt wurden 242 Stuhlproben von 167 verschiedenen Patienten gesammelt. Die Differenz zwischen den Patientenzahlen und der Anzahl der Stuhlproben ergab sich daraus, dass von einigen Patienten mehrere Stuhlproben eingeschickt und untersucht wurden.

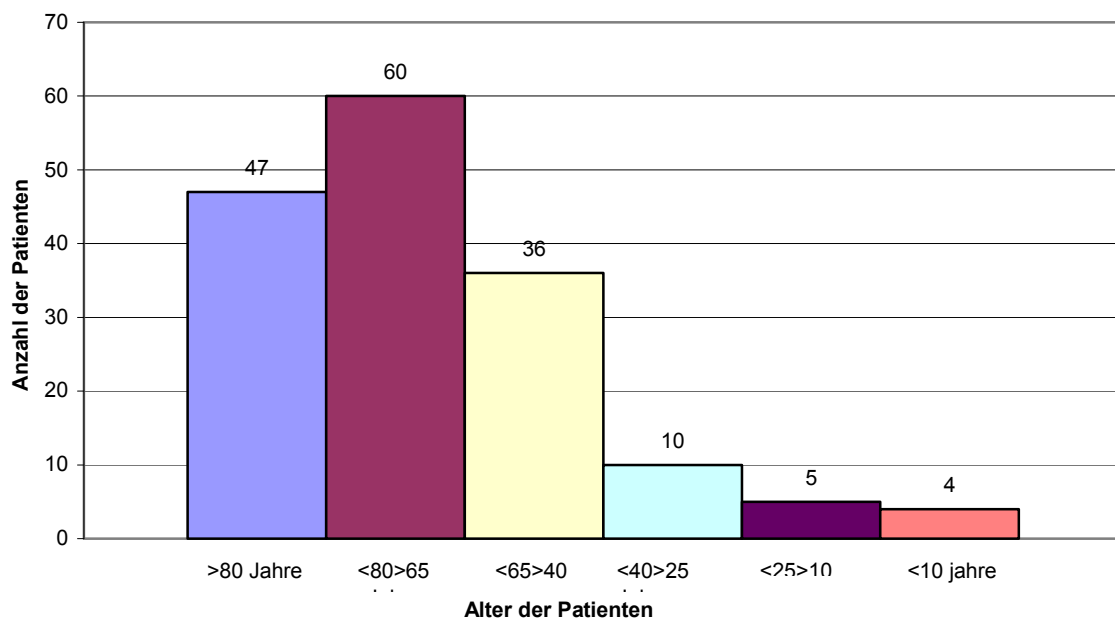
Von den 167 Patienten waren 111 Patienten tatsächlich an einer CDI erkrankt, bei 56 Patienten wurde der Verdacht auf eine *Clostridium difficile* Erkrankung im Toxin-ELISA dagegen nicht bestätigt. Von den 167 verschiedenen Patienten waren 85 Patienten (50,9%) auf einer internistischen Station untergebracht. Dabei lagen 38 Patienten auf den Stationen für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel-Erkrankungen und 20 Patienten auf den Stationen der Hämatologie, Onkologie und Immunologie. Die restlichen internistischen Patienten waren auf Stationen der Kardiologie, Nephrologie, Pulmologie, Pädiatrie, der Chemotherapeutischen Ambulanz und der Hämodialyse- Ambulanz untergebracht.

5 Stuhlproben waren vom Personalarzt des Universitätsklinikums Marburg mit Verdacht auf *Clostridium difficile* eingeschickt worden und wurden als „internistische“ Proben gezählt.

82 Patienten (49,1%) lagen stationär auf chirurgisch orientierten Stationen, wobei davon 18 Patienten auf Stationen der Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, 17 Patienten auf orthopädischen Stationen und 10 Patienten auf urologischen Stationen lagen. Weitere Unterbringungen der chirurgischen Patienten waren die Herz- und Gefäßchirurgie, die Hand-, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, die Gynäkologie, die Zahnheilkunde und die Dermatologie. Insgesamt waren von den 167 Patienten 21 Patienten auf den verschiedenen Intensivstationen untergebracht. In Abbildung 4 ist die Altersverteilung

der 167 Patienten dargestellt, wobei in Abhängigkeit vom Alter der Patienten 6 verschiedene Patientengruppen gebildet wurden. Bei 5 (2,99%) Patienten war in der elektronischen Datenbank Swisslab kein Geburtsdatum angegeben. Zunächst ließ sich feststellen, dass die Zahl der Patienten mit zunehmenden Alter ansteigt. Außerdem fiel auf, dass die beiden größten Gruppen die Gruppe der Patienten zwischen 65 und 79 Jahren (60 Patienten) und die Gruppe der über 80 jährigen Patienten (47 Patienten) sind. Insgesamt waren damit 110 Patienten (64,3%) über 65 Jahre. In der Altersgruppe der Patienten zwischen 40 und 64 Jahre waren 36 Patienten, in der Gruppe der 25-39 Jährigen waren 10 Patienten und die Gruppe der Patienten zwischen 10 und 24 Jahren umfasste 5 Patienten. Nur 4 Patienten waren jünger als 10 Jahre.

Abb.4: Altersverteilung der Patienten



4.3 Untersuchung der Umgebungsproben

4.3.1 Quantifizierung der Umgebungsproben

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die DNA aus 531 Abstrichproben aus der Umgebung verschiedener Krankenhauspatienten-Gruppen mittels Real-time-PCR zum Nachweis der 16S rRNA von *Clostridium difficile* und zur Ermittlung der Zellzahl

untersucht. Dazu wurde das gleiche Real-time-PCR Protokoll verwendet wie für die Quantifizierung der Stuhlproben. Die Proben waren im Zeitraum vom Januar 2007 bis zum November 2007 entnommen worden. Bei der Studie wurden Abstrichproben folgender drei Patientengruppen miteinander verglichen:

Proben aus der Umgebung von *Clostridium difficile* positiven-Patienten (156 Proben), Proben aus der Umgebung von *Clostridium difficile* negativen Patienten, die mit *Clostridium difficile* –positiven Patienten auf einer Station lagen (190 Proben) und Proben aus der Umgebung von *Clostridium difficile* negativen Patienten von Stationen auf denen seit 6 Monaten kein Patient mehr positiv auf *Clostridium difficile* getestet worden war (185 Proben). Letztere Gruppe umfasste vor allem die neurochirurgischen Stationen, die Wöchnerinnenstation mit dem Kreissaal und die nephrologische Intensivstation. Abstrichorte waren der Fußboden des Patientenzimmers (55 Proben), die Hände des Patienten (91 Proben), die Hände des Personals (59 Proben), die nähere Umgebung des Patienten (<1m) (142 Proben) und die entfernte Umgebung des Patienten (>1m) (184 Proben). Obwohl versucht wurde, in jedem Patientenzimmer möglichst gleich viele Proben zu entnehmen, war dies nicht immer möglich, da die Zimmer teilweise sehr unterschiedlich ausgestattet waren und nicht in jedem Zimmer von den gleichen Orten Proben genommen werden konnten. So war zum Beispiel auf Intensivstationen in den Zimmern oft kein Tisch aber eine große Anzahl Überwachungsmonitore vorhanden. Außerdem gab es z.B. auch Zimmer ohne eigene Toilette. Von den 156 Proben aus der Umgebung der *Clostridium difficile*-positiven Patienten waren 68 (43,6%) Proben über dem Cut-Off von 10^2 Zellen/ml und damit im Nachweis von *Clostridium difficile* positiv. Die Proben mit den höchsten Zellzahlen waren eine Abstrichprobe von der Hand eines Patienten mit einer Zellzahl von $6,1 \times 10^4$ Zellen/ml und eine Probe vom Fußboden mit einer Zellzahl von $6,0 \times 10^4$ Zellen/ml. Unter den 190 Proben von *Clostridium difficile*-negativen Patienten auf *Clostridium difficile* positiven Stationen konnte bei 99 (53,5%) Proben *Clostridium difficile* nachgewiesen werden, bei den 185 Proben *Clostridium difficile* negativen Patienten auf *Clostridium difficile* negativen Stationen waren 48 (26,0%) Proben positiv. Im Vergleich der Zellzahlen der Umgebungsproben der drei Stationstypen (Tabelle 5) zeigte sich, dass die Proben aus der Umgebung *Clostridium difficile*-negativer Patienten von *Clostridium difficile*-negativen Stationen signifikant niedrigere Zellzahlen in den Proben von Fußboden und der näheren Umgebung (<1m) aufwiesen als die Proben von *Clostridium difficile*-positiven Patienten.

Die Proben aus der Umgebung *Clostridium difficile*-negativer Patienten von *Clostridium difficile*-positiven Stationen hatten nur bei den Proben vom Fußboden signifikant niedrigere Zellzahlen als die Proben *Clostridium difficile*-positiver Patienten. Zwischen allen anderen Patienten und Proben-Gruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Auch zwischen den Zellzahlen der Proben von Personal und Patientenhänden der verschiedenen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Tab.5: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzahlen der unterschiedlichen Umgebungsproben

Station Status	Patienten Status	Fußboden		Patientenhände		Personalhände		Nähere Umgebung <1m		Entferntere Umgebung >m	
		M	S	M	S	M	S	M	S	M	S
Cd+	Cd+	9117,3	3701,6	5535,0 ^a	2537,7	1549,7 ^a	693,0	2768,4 ^a	1153,7	2825,7 ^a	1293,1
Cd+	Cd-	843,1	319,4	2158,4 ^a	777,4	663,1 ^a	250,7	661,2 ^a	204,5	4133,4 ^a	2213,6
Cd-	Cd-	1028,1	362,0	1811,0 ^a	740,8	215,6 ^a	98,8	321,6	96,2	639,6 ^a	247,1

Cd, *Clostridium difficile*

M, Mittelwerte

S, Standardabweichung

^a, Mittelwerte zeigen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

4.3.2 Korrelationsanalyse der Umgebungsproben

Nach Berechnung der Zellzahlen wurde mit Hilfe einer Korrelationsanalyse untersucht, ob zwischen den Proben der verschiedenen Abstrichorte Zusammenhänge nachgewiesen werden können. In Tabelle 6 ist dargestellt wie die verschiedenen Proben-Gruppen miteinander korrelieren, dabei ist r der Spearman Korrelationskoeffizient und ein Maß für die Stärke des gefundenen Zusammenhangs. Die Berechnungen zeigten, dass die *Clostridium difficile* Zellzahlen aus den Fußbodenproben und den Proben der Patientenhände mit einem r von 0,75 hoch signifikant korrelierten. Bei den Proben vom Fußboden wurde außerdem ein starker Zusammenhang mit den Proben von Händen des Personals nachgewiesen ($r=0,72$). Eine Korrelation konnte zudem zwischen den

Zellzahlen aus den Proben von den Händen des Personals und den Proben aus der näheren Umgebung (<1m) festgestellt werden ($r=0,73$). Mit den Zellzahlen der Proben aus der entfernten Umgebung (>1m) waren die Proben vom Fußboden mit einem r von 0,71 korreliert. Auch zwischen den Zellzahlen der Proben der entfernten Umgebung (>1m) und den Proben von den Patientenhänden zeigte sich eine Verbindung ($r=0,65$), sowie zwischen den Proben der näheren Umgebung (>1m) und den Fußbodenproben ($r=0,68$).

Tab.6: Korrelationen der Zellzahlen zwischen den unterschiedlichen Umgebungsproben

	Fußboden	Patientenhände	Personalhände	Nähere Umgebung <1m	Entferntere Umgebung >1m
Fußboden	1,00				
Patientenhände	0,75 ^{***a}	1,00			
Personalhände	0,72 ^{***a}	0,60 ^{**b}	1,00		
Nähere Umgebung <1m	0,68 ^{**b}	0,47 ^{**}	0,73 ^{***a}	1,00	
Entferntere Umgebung >1m	0,71 ^{***a}	0,65 ^{**b}	0,58 ^{**}	0,57 ^{**}	1,00

^{**} $p < 0,01$, ^a $r > 0,70$, ^b $r < 0,6$ und $r > 0,7$

Um den Effekt der gemessenen Zellzahlen von Personal und Patientenhänden auf die Zellzahlen der anderen Umgebungsproben abzuschätzen, wurde ein Lineares Regressionsmodell entwickelt, wobei die Bakterienzahlen von Personal und Patientenhänden als unabhängige Variable und die Bakterienzahlen der anderen Umgebungsproben als abhängige Variable eingesetzt wurden (Tabelle 7). Unter Verwendung des unbereinigten Bestimmtheitsmaßes zeigte sich, dass die Zellzahlen von Personal und Patientenhänden hoch signifikant mit den Zellzahlen von Fußboden sowie näherer und entfernter Umgebung assoziiert waren. Unter Verwendung des korrigierten Bestimmtheitsmaßes wurde dann deutlich, dass die Zellzahlen der Personalhände tatsächlich alle anderen Probengruppen beeinflussen, während die Zellzahlen der Patientenhände nur mit den Zellzahlen von Fußboden und entfernter Umgebung aber nicht mit denen der näheren Umgebung in einem Abhängigkeitsverhältnis standen.

Tab.7: Einfluss der Zellzahlen von Personal und Patientenhänden auf die Zellzahlen der anderen Umgebungsproben

	Fußboden $\beta \pm \text{SE}$	Nähere Umgebung(<1m) $\beta \pm \text{SE}$	Entfernte Umgebung(>1m) $\beta \pm \text{SE}$
<i>Unbereinigtes</i>			
<i>Bestimmtheitsmaß</i>			
Personalhände	0,80±0,15**	1,06±0,17**	0,84±0,21**
Patientenhände	0,62±0,10**	0,53±0,15**	0,74±0,13**
<i>Korrigiertes</i>			
<i>Bestimmtheitsmaß</i>			
Personalhände	0,44±0,19*	1,02±0,21**	0,40±0,22*
Patientenhände	0,39±0,15*	0,02±0,17	0,60±0,18**

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

5. Diskussion

5.1 Weitere Etablierung und Optimierung des Real-time-PCR Assays basierend auf der Gensequenz der 16S rRNA von *Clostridium difficile*

Zu Beginn dieser Arbeit wurde ein Real-time-PCR Assay zum Nachweis der spezies-spezifischen Gensequenz der 16S rRNA von *Clostridium difficile* weiter etabliert, da eine möglichst hohe Spezifität des verwendeten Real-time-PCR Assays die Voraussetzung für die anschließende Quantifizierung von *Clostridium difficile* in den Stuhlproben und Umgebungsproben darstellt. Dazu wurden DNA-Proben und Lysate von 15 verschiedenen Bakterien mit dem Real-time-PCR Assay getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die Nachweisgrenze des verwendeten Real-time-PCR Assays bei einer Zellzahl von 1×10^2 Zellen/ml liegt, was 4×10^4 Zellen/g Stuhl entspricht. Trotz der ermittelten hohen Nachweisgrenze kann nie ganz ausgeschlossen werden, dass es nicht doch zu falsch-positiven Ergebnissen kommt, da die intestinale Flora ein äußerst kompliziertes System darstellt und aus einer großen Zahl verschiedenster Bakterienspezies aufgebaut ist, die zum Teil noch nicht beschrieben sind (Guarner *et al.*, 2003).

5.2 Vergleich der Real-time-PCR mit anderen Nachweismethoden von *Clostridium difficile*

In dieser Arbeit wurden sowohl ein Real-time-PCR Assay als auch verschiedene konventionelle PCR-Methoden verwendet. Das weiter etablierte Real-time-PCR Assay basierte auf dem Nachweis der Gensequenz der 16S rRNA von *Clostridium difficile*, die konventionellen PCR Assays wurden zum Nachweis der Gensequenzen der drei Toxine von *Clostridium difficile* verwendet.

Im Rahmen der Etablierung des Real-time-PCR Assays wurde Stämme von *Clostridium difficile* aus der Stammsammlung des Instituts für Krankenhaushygiene und Mikrobiologie auf Selektivnährmedien angezüchtet. Im Unterschied dazu wurde bei der Testung der Stuhl- und Umgebungsproben auf den kulturellen Nachweis verzichtet. Da die kulturelle Anzucht von *Clostridium difficile* aus Stuhl kompliziert und langwierig ist, verzichtet man in der Routinediagnostik darauf und führt stattdessen den auch hier verwendeten indirekten Nachweis über die Toxine. Auch wenn die gezielte Isolierung

von *Clostridium difficile* aus dem Bakterienrasen viel Erfahrung verlangt und leicht zu Fehlinterpretationen führen kann (Vaughan *et al.*, 2003) ist ein wichtiger Vorteil des kulturellen Nachweises, dass alle *Clostridium difficile* Stämme erfasst werden, unabhängig davon ob sie zur Toxinbildung fähig sind. Außerdem stehen die angezüchteten Bakterienstämme zur Antibiotikatestung zur Verfügung.

Die konventionelle PCR-Methode wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt und stellt eine sehr sensitive und spezifische Methode zum Nachweis bestimmter Genabschnitte der DNA dar (Mullis *et al.*, 1986). Allerdings ist auch die konventionelle PCR relativ zeit- und arbeitsaufwendig. Außerdem besteht im Vergleich zu anderen molekularbiologischen Methoden wie z.B. der Real-Time-PCR eine größere Gefahr von Kontaminationen, insbesondere durch die sich der eigentlichen PCR anschließenden Gelelektrophorese. Ein Problem stellt auch die mögliche unspezifische Primerbindung dar. Der größte Nachteil im Vergleich zu Real-time-PCR Methoden ist allerdings, dass nur ein rein qualitativer Nachweis möglich ist und keine Aussage zur Zellzahl bzw. Bakteriendichte gemacht werden kann.

Die Real-time-PCR als relativ neue molekularbiologische Methode hat im Vergleich zur konventionellen PCR und zum kulturellen Nachweis viele Vorteile: Der bei der Real-time-PCR Methode erforderliche Arbeitsaufwand im Labor ist wesentlich geringer und weniger zeitaufwendig als bei der konventionellen PCR und dem kulturellen Nachweis. Damit ist die Real-time-PCR besonders für große Probenzahlen geeignet. Außerdem kommt es weniger leicht zu Kontaminationen, da die ganze PCR-Reaktion im geschlossenen Reaktionsgefäß stattfindet und die elektrophoretische Auftrennung entfällt (Huijsdens *et al.*, 2002). Ein Vorteil der Real-time-PCR ist auch die höhere Spezifität von 97% gegenüber der konventionellen PCR (92% Spezifität), da nur dann ein Fluoreszenzsignal abgegeben wird wenn beide Primer und die spezifische Sonde gebunden haben (Ackermann *et al.*, 2004a).

Zudem lässt sich mit der Real-time-PCR nicht nur eine qualitative Aussage machen, sondern auch eine quantitative Aussage. Das bedeutet, dass auch auf die Erregerdichte in der untersuchten Probe geschlossen werden kann, was mit der konventionellen PCR und dem kulturellen Nachweis nicht möglich ist. Der Nachteil der Real-time-PCR Methode ist, dass dieses Verfahren vergleichsweise teuer ist.

In der Literatur sind mehrere Studien zum spezifischen Nachweis der 16S rRNA von *Clostridium difficile* mittels Real-time-PCR erwähnt (Peterson *et al.*, 2007; Penders *et al.*, 2005; Rinttilä *et al.*, 2004; Belanger *et al.*, 2003). Hypervariable Regionen der 16S

rRNA bedingen die Differenzierung in unterschiedliche Spezies, die im Laufe der Evolution entstanden sind. Andererseits verfügt die 16S rRNA über sehr konsistente Bereiche die während der Evolution nicht durch Mutationen verändert wurden (Park *et al.*, 2005). Aus diesen Gründen ist die 16S rRNA besonders gut zum Nachweis und zur Identifizierung von Mikroorganismen geeignet. In Bezug auf *Clostridium difficile* bietet der Nachweis der 16S rRNA zudem den Vorteil, dass sowohl toxinbildende als auch nicht toxinbildende *Clostridium difficile* Stämme nachgewiesen werden. Somit werden auch alle asymptomatischen *Clostridium difficile* Träger erkannt. Andererseits kann mit einer PCR, die allein auf dem Nachweis der Gene der 16S rRNA basiert, nicht zwischen symptomatischen und asymptomatischen Trägern unterschieden werden. Daher sind im Anschluss an die PCR noch Testungen zum Nachweis der Toxine nötig, wie zum Beispiel mit ELISA Systemen wie dem RIDASCREEN® *Clostridium difficile* ToxA/B Kit, oder mit Hilfe einer weiteren PCR. In der Literatur sind auch Real-time-PCR Assays beschrieben, die auf der Gensequenz von Toxin A oder Toxin B oder beiden Toxinen basieren. PCR Assays die nur ein Toxin detektieren, wie z.B. das von Van den Berg und Kollegen entwickelte Real-time-PCR Assay zum Nachweis von Toxin B (Van den Berg *et al.*, 2006), haben den Nachteil, dass nicht Toxin bildende Stämme und Stämme die nur Toxin A bilden nicht nachgewiesen werden können. Belanger und Kollegen entwickelten ein Multiplex Real-time-PCR Assay zum Nachweis von Toxin A und B (Belanger *et al.*, 2003), wodurch zwar auch die *Clostridium difficile* Stämme detektiert werden konnten die nur eines der beiden Toxine bildeten, allerdings konnten auch hier nicht toxigene Stämme nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zunächst alle Stuhlproben und Umgebungsproben mit Hilfe des weiter etablierten Real-time-PCR Assays auf die Anwesenheit der 16S rRNA Gene hin untersucht. Danach wurden alle Proben mittels konventioneller PCR auf Toxin A, B und das Binary-Toxin getestet. Auf diese Weise war es möglich, zwischen den verschiedenen Varianten der toxigenen und nicht toxigenen *Clostridium difficile* Stämme zu unterscheiden.

5.3 Sensitivität und Spezifität der Real-time-PCR zum Nachweis von *Clostridium difficile* in Stuhlproben

Der Goldstandard in der *Clostridium difficile* Diagnostik ist die Zytotoxizitätstestung in der Zellkultur, da dieses Verfahren die größte Sensitivität (94%-100%) und Spezifität (99%) aufweist (Doern *et al.*, 1992). Allerdings ist der Nachweis der Zytotoxizität sehr aufwendig und wird in Routinelaboratorien in der Diagnostik nicht regelhaft eingesetzt. Stattdessen werden in der Routinediagnostik, so wie auch in der Diagnostik des Instituts für Krankenhaushygiene und Mikrobiologie in Marburg, ELISA Tests zum Nachweis von Toxin A, Toxin B, oder beiden Toxinen verwendet. Insgesamt wurden 242 Stuhlproben untersucht, davon waren 161 (66,5%) Proben mittels ELISA positiv und 81 (3,5%) negativ auf Toxin A und B getestet worden. Wie zu erwarten bestätigte sich im anschließenden Real-time-PCR Assay bei den im ELISA positiv getesteten Proben in 98,1% der Fälle das positive Ergebnis, nur drei Proben (1,9%) wurden im trotz des positiven ELISA Ergebnisses im Real-time-PCR Assay negativ getestet. Diese drei in der Real-time-PCR falsch negativen Proben können einerseits durch eine zu geringe Sensitivität der Real-time-PCR erklärt werden, andererseits können auch Fehlinterpretationen beim Ablesen des ELISA Ergebnisses oder eine zu geringe Spezifität des ELISAs der Grund sein. Da bei einem Threshold von 10^2 Zellen/ml die Sensitivität der Real-time-PCR jedoch bei fast 99% liegt, lag der Fehler eher im ELISA. Von den zuvor im ELISA negativ getesteten Proben konnten bei einem Detektionslimit von 10^2 Zellen/ml in der Real-time-PCR fast 40% der Proben positiv getestet werden. Gründe hierfür könnten eine zu geringe Spezifität des Real-time-PCR Assays, aber auch eine zu geringe Sensitivität des ELISAs sein. Die Real-time-PCR war zu Beginn dieser Arbeit weiter etabliert worden. Von DNA und Lysat der 15 getesteten verschiedenen Bakterien waren nur die Proben von *Clostridium difficile* sowie eine DNA-Probe von *Clostridium perfringens* positiv getestet worden. Die eine DNA-Probe von *Clostridium difficile* ließ jedoch im Vergleich zu den *Clostridium-difficile*-Proben nur auf eine sehr geringe Bakteriendichte schließen und konnte damit vernachlässigt werden. Somit kann von einer ausreichenden Spezifität der Real-time-PCR ausgegangen werden. In einer Studie konnte dagegen gezeigt werden, dass ein ELISA nur eine Sensitivität von 73,3% gegenüber 93,3% in einer Real-time-PCR erreichte (Peterson *et al.*, 2007). Ein weiterer Grund für die im ELISA negativ, aber in der Real-time-PCR positiv getesteten Proben könnten auch die unterschiedlichen Testansätze von ELISA und Real-time-PCR sein.

In dem verwendeten ELISA wurden die Stuhlproben auf Toxin A und B hin geprüft. Das verwendete Real-time-PCR Assay basierte jedoch auf der Gensequenz der 16S rRNA von *Clostridium difficile*. Das bedeutet, der ELISA weist nur toxinbildende *Clostridium difficile* Stämme nach, während mit dem Real-time-PCR Assay auch nicht toxinbildende *Clostridium difficile* Stämme erfasst werden. Die Inzidenz von *Clostridium difficile* Trägern wird oft unterschätzt. Nach einer Antibiotikatherapie wird ein Großteil aller hospitalisierten Patienten zu asymptomatischen Trägern. Die Zahl der Patienten, die mit einem nicht toxigenen *Clostridium difficile* Stamm infiziert sind, ist größer als die Zahl der Patienten, die auch tatsächlich an CDI und Diarrhöe leiden (McFarland *et al.*, 1989). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass 20% aller Patienten, die auf die Anwesenheit von 16S rRNA getestet wurden, Träger eines nicht toxigenen *Clostridium difficile* Stamms waren (Wilson *et al.*, 2003).

Obwohl diese asymptomatischen Träger klinisch nicht relevant sind, sollten diese Personen ärztlich beobachtet werden. Patienten, die einen nicht toxigenen *Clostridium difficile* Stamm in sich tragen, sind nämlich für eine Infektion mit toxigenen Stämmen besonders anfällig und können gleichzeitig Träger verschiedener Stämme sein, wodurch das Übertragungsrisiko deutlich erhöht wird. Bei einem cut-off von 10^2 Zellen/ml bzw. 4×10^4 Zellen/g Stuhl konnte in der Real-time-PCR in Bezug zum ELISA eine fast 99% Sensitivität und ein maximaler Prozentsatz korrekt klassifizierter Proben von fast 86% erreicht werden. Bei Thresholds von mehr als 10^6 Zellen/ml wurde ein Abfall der Sensitivität beobachtet. Bezüglich der Spezifität konnten auch bei einem cut-off von 10^2 Zellen/ml noch gute Werte erreicht werden, obwohl bei höheren Thresholds eine höhere Spezifität erzielt wurde. Mit einer Nachweisgrenze von 4×10^4 Zellen/g Stuhl und einer Sensitivität von fast 99% ist der in dieser Arbeit weiteretablierte Real-time-PCR Assay deutlich sensitiver als das in einer Studie von Van den Berg *et al.* (2005) beschriebene Real-time-PCR Assay, bei dem *Clostridium difficile* erst ab 1×10^5 Zellen/g Stuhl spezifisch nachgewiesen wurde. Belanger und Kollegen (2003) etablierten ein Real-time-PCR Assay zum Nachweis von *Clostridium difficile* basierend auf molecular beacons-Sonden was mit einer Nachweisgrenze von 5×10^4 Zellen/g Stuhl mit dem in dieser Studie weitetablierten Real-time-PCR Assay vergleichbar ist. Allerdings basierte das verwendete PCR Assay auf dem Nachweis von Toxin A und B und nicht auf dem Nachweis der 16S rRNA. Auch die Ergebnisse der Arbeit von Rinttilä und Kollegen (2004) zur Entwicklung einer PCR zum Nachweis der 16S rRNA von *Clostridium difficile* sind mit einer Nachweisgrenze von 6×10^4 Zellen/g Stuhl mit den Ergebnissen in

dieser Arbeit vergleichbar. Allerdings verwendeten Rinttilä und Kollegen eine SYBR Green PCR anstelle der in dieser Studie eingesetzten Real-time-PCR. Das von Penders et al. (2005) entwickelte Real-time-PCR Assay zum Nachweis der Gensequenz der 16S rRNA von *Clostridium difficile* verfügt über eine Nachweisgrenze von 2×10^3 Zellen/g Stuhl und ist damit 10fach sensitiver als das in dieser Arbeit weiter etablierte PCR Assay. In einer Studie von Peterson et al. (2007) konnte mit einem Real-time-PCR Assay zur Detektion von *Clostridium difficile* aus Stuhlproben eine Sensitivität von 93,3% erreicht werden, was unter der in dieser Studie ermittelten Sensitivität von fast 99% bei einer Nachweisgrenze von 4×10^4 Zellen/g Stuhl liegt.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass das in dieser Arbeit verwendete Real-time-PCR Assay zum Nachweis der 16S rRNA von *Clostridium difficile* aus Stuhlproben im Vergleich mit anderen Veröffentlichungen vergleichbare und teilweise sogar bessere Ergebnisse erzielt.

Mit Hilfe einer ROC-Kurve konnte gezeigt werden, dass die beste Kombination von Sensitivität und Spezifität bei einem Treshold von 10^4 Zellen/ml mit einer Sensitivität von fast 87% und einer Spezifität von fast 82% erreicht wurde, was die Annahme unterstützt, dass zum Nachweis und zur Ausbildung klinischer Symptome eine bestimmte Menge *Clostridium difficile* vorhanden sein muss.

5.4 Toxinnachweis in der DNA aus Stuhlproben

Clostridium difficile kann drei verschiedene Toxine, Toxin A, Toxin B und das Binary-Toxin ausbilden. Beim Patient kommt es nur dann zu einer klinischen Symptomatik wenn *Clostridium difficile* Toxine produziert. Mit Hilfe verschiedener konventionellen PCR Assays wurden alle 242 Stuhlproben auf die Anwesenheit der drei Toxine geprüft. Die meisten pathogenen *Clostridium difficile* Stämme produzieren vor allem Toxin A und Toxin B (von Eichel-Streiber et al., 1996; Ackermann et al., 2004), was auch im Rahmen der Stuhlproben-Untersuchungen in dieser Studie bestätigt wurde. So zeigte sich, dass die meisten Proben entweder Toxin A und B negativ waren oder für beide Toxine positiv. Ein nicht unerheblicher Anteil der Stuhlproben wurde Toxin A negativ und Toxin B positiv getestet, was sich mit den Ergebnissen anderer Studien deckt. In den letzten Jahren wurde verstärkt eine steigende Zahl an Toxin A negativen und Toxin B positiven Stämmen beschrieben (Van den Berg et al., 2005; Wroblewska et al., 2005; Drudy et al., 2007; Kim et al., 2008). In einer Studie konnte in einem Hamstermodell

außerdem gezeigt werden, dass vor allem Toxin B den entscheidenden Virulenzfaktor darstellt (Lyras et al., 2009). Der in dieser Studie nachgewiesene Prozentsatz von 15,7% A-/B+ Stämmen war kleiner als die Prävalenzen an A-/B+ Stämmen in anderen Studien. So fanden Kim et al. (2008) eine Prävalenz von 21,4% und Samra und Kollegen (2002) konnten einen Prozentsatz von 56,5% an Toxin A negativen und Toxin B positiven Stämmen nachweisen. Die erhöhte Prävalenz an Toxin A negativen und B positiven Stämmen zeigt, wie wichtig es ist bei der Toxintestung beide Toxine nachzuweisen, da sonst ein Teil der *Clostridium difficile* Stämme nicht erkannt würden. In einer Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass Toxin A negative Toxin B positive Stämme Verursacher endemischer Ausbrüche sein können (Sato et al., 2004). Um herauszufinden, ob die in dieser Arbeit nachgewiesenen A-/B+ Stämme ein und demselben Subtyp angehören, wären allerdings noch weiterführende Untersuchungen mittels Pulsfeldelektrophorese nötig gewesen.

In 4,1% der Stuhlproben konnten mittels konventioneller PCR die beiden Gene *cdtA* und *cdtB* des Binarytoxins nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis war vergleichbar mit Angaben in der Literatur, so wurden Binary-Toxin Prävalenzen zwischen 4,0% und 12,0% beschrieben (Goncalves et al., 2004; Stubbs et al., 2000). Der Nachweis von beiden Binary-Toxin Komponenten *cdtA* und *cdtB* ist insofern von Bedeutung, da es auch Stämme gibt, die nur eines der beiden Gene exprimieren. Die Voraussetzung für ein funktionierendes Binary-Toxin ist jedoch das Vorhandensein beider Komponenten (Perelle et al., 1997). Alle nachgewiesenen Binary-Toxine in dieser Studie waren auch für beide Komponenten positiv. Die meisten Binary-Toxin positiven *Clostridium difficile* Stämme sind auch positiv für Toxin A und B (Perelle et al., 1997; Rupnik et al., 2003), was auch im Rahmen dieser Studie bestätigt wurde. Bis auf eine Probe waren alle Binary-Toxin positiv getesteten Proben auch für Toxin A und Toxin B positiv. Eine Binary-Toxin positive Probe war jedoch nur für Toxin A positiv. Das Binary-Toxin wird in 2% der Fälle auch von *Clostridium difficile* Stämmen gebildet, die weder Toxin A noch Toxin B besitzen (Geric et al., 2003), ein solcher Stamm konnte in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Rolle des 1988 von Popoff et al. zum ersten Mal beschriebenen Binary-Toxins bei der Pathogenese von *Clostridium difficile* ist nach wie vor unklar. Es scheint sich jedoch um einen zusätzlichen Pathogenitätsfaktor zu handeln. In einer Studie mit Hamstern konnte gezeigt werden, dass das Binary-Toxin alleine, ohne Anwesenheit von Toxin A und Toxin B, keine Symptome verursacht (Geric et al., 2006). Der *Clostridium difficile* Stamm Nap1/027 verfügt neben der

charakteristischen Deletion im *tcdC* Gen auch über das Binary-Toxin. Nap1/027 ist durch die *tcdC*-Gen Deletion zu einer 16mal größeren Produktion von Toxin A und einer 23mal größeren Produktion von Toxin B befähigt (Warny et al., 2005). Dadurch kommt es zu deutlich schwereren Krankheitsverläufen und einer erhöhten Morbidität und Mortalität. Inwiefern das Binary-Toxin hierbei eine Rolle spielt ist nicht geklärt. Nap1/027 wurde 2001 zuerst in Kanada und den USA beschrieben, mittlerweile hat sich der Stamm jedoch weltweit verbreitet und wurde auch schon in Deutschland nachgewiesen (Zaiss et al., 2007). In den Niederlanden, wo der Stamm Nap1/027 europaweit zum ersten Mal nachgewiesen wurde, scheint sich allerdings mittlerweile ein Rückgang der Inzidenz von Nap1/027 abzuzeichnen (Hensgens, M.P. et al., 2009). Seit 2005 wurde vermehrt auch das Auftreten eines *Clostridium difficile* Stamms vom Ribotyp 078 beobachtet. Dieser Stamm verfügt ebenso wie Nap1/027 über ein Binary-Toxin und eine Deletion im *tcdC*-Gen, hat aber zusätzlich eine Punktmutation an Position 184. (Goorhuis et al., 2008).

Im Rahmen dieser Studie wurde zwar in 4,13% der Fälle das Binary-Toxin nachgewiesen, ob es sich bei den untersuchten Stämmen um den Typ Nap1/027 oder den Typ 078 handelt, wurde allerdings nicht weiter untersucht.

5.5 Vergleich von ELISA und konventioneller PCR zum Nachweis von Toxin A und B

Insgesamt wurden 161 Proben im ELISA positiv und 81 Proben negativ getestet. Der ELISA basierte auf dem Nachweis von Toxin A und Toxin B, es war also zu erwarten, dass in der konventionellen PCR zum Nachweis von Toxin A und Toxin B die im ELISA positiv getesteten Proben ebenfalls positiv reagierten. Bei 18 Proben, die im ELISA zuvor positiv getestet worden waren, ließ sich in der PCR jedoch weder Toxin A noch Toxin B nachweisen.

Der Grund hierfür könnte zum einen in einer zu geringen Sensitivität der konventionellen PCR Assays oder einer zu geringen Spezifität des ELISAs liegen. In der Literatur wird die Spezifität des Ridascreen ELISAs mit 97% (Vanpoucke et al., 2001) und die Sensitivität der Primer für Toxin B mit 97% (Belanger et al., 2003) angegeben. Ein weiterer Grund könnten PCR-Inhibitoren sein, die trotz der DNA-Aufreinigung noch in geringen Mengen in den Proben vorhanden waren, wie z.B. Gallensalze oder Bilirubin (Monteiro et al., 1997). Auffallend war, dass mehrere der 18

Proben von denselben Patientinnen stammten. So waren alle 5 Proben von Frau H. zwar im ELISA positiv getestet worden aber in der PCR negativ. Ebenso waren 2 Proben von Frau B. im ELISA positiv und in der PCR negativ getestet worden.

Von den 81 im ELISA negativ getesteten Proben reagierten wider Erwarten 9 Proben in der konventionellen PCR zum Nachweis der Toxine positiv. Dabei ließ sich bei 4 Proben sowohl Toxin A als auch Toxin B nachweisen, 5 Proben waren Toxin A negativ und Toxin B positiv und in einer Probe konnte sogar das Binarytoxin detektiert werden. Als Ursache kommt hierfür am ehesten die zu geringe Sensitivität des verwendeten ELISAs in Frage, die in einer Studie mit 57% angegeben wird (Vanpoucke et al., 2001). Das bedeutet, dass von den 81 Patienten die nach der Testung ihrer Stuhlproben das Ergebnis „*Clostridium difficile* negativ“ mitgeteilt bekommen hatten, 9 Patienten *Clostridium difficile* positiv waren und darüber nicht richtig informiert wurden. Diese Patienten wurden natürlich auch nicht isoliert und es wurden keine Hygienemaßnahmen vorgenommen. Das ist insofern eklatant, da diese 9 Patienten eine Verbreitungsquelle von *Clostridium difficile* darstellten und leicht andere Patienten anstecken konnten.

5.6 Vergleich der Quantifizierung mittels Real-time-PCR mit dem Toxinnachweis mittels ELISA

Infizierte Personen haben im Vergleich zu asymptomatischen *Clostridium difficile* Trägern eine deutlich erhöhte Bakterien- und Sporenzahl im Darm und scheiden auch mehr Bakterien und Sporen mit dem Stuhl aus. Mulligan und Kollegen (1979) stellten fest, dass Infizierte mehr als 10^5 Zellen/g Stuhl ausscheiden. Laut Burkardt (1992) ist eine Sporenzahl ab 10^6 Zellen/g Stuhl in Stuhlproben zur Diagnose einer Infektion mit *Clostridium difficile* signifikant. Im Rahmen dieser Studie konnte festgestellt werden, dass die Proben die im Toxinnachweis mittels ELISA positiv getestet worden waren auch deutlich höhere Zellzahlen aufwiesen. Die Wahrscheinlichkeit, dass im ELISA positiv getestete Proben Zellzahlen zwischen 10^6 und 10^7 Zellen/ml hatten war zwischen 5,1 und 6,5 mal größer als bei Proben, die im ELISA negativ getestet worden waren. Demnach scheinen Personen, die mit einem toxinbildenden Stamm infiziert sind, eine höhere Zellzahl *Clostridium difficile* im Stuhl und damit auch im Darm zu haben.

5.7 Risikofaktoren

Es sind viele Risikofaktoren im Zusammenhang mit *Clostridium difficile* assoziierten Erkrankungen bekannt. Wichtige Risikofaktoren sind vor allem die Einnahme von Antibiotika, das Alter des Patienten und die Dauer des Krankenhausaufenthalts. Außerdem spielt die Immunlage des Patienten eine Rolle, beispielsweise wenn das Immunsystem durch eine HIV-Erkrankung oder Malignome beeinflusst wird. Ein weiterer Risikofaktor sind Bauchoperationen und Sondenernährung (Mc Farland et al., 2007). Zudem kann bei Chemotherapie und Radiatio die normale Darmflora gestört sein, so dass *Clostridium difficile* sich leichter ansiedeln kann (Kelly, LaMont, 1998).

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 242 Stuhlproben von 167 Patienten untersucht, wobei in etwa gleich viele Patienten von internistischen (50,9%) wie chirurgischen (49,1%) Stationen miteinbezogen wurden. Bei den Patienten von internistischen Stationen fiel auf, dass über die Hälfte der Patienten auf Stationen der Klinik für Gastroenterologie und Endokrinologie und auf Stationen der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie lagen. Die erhöhte Patientenzahl von Stationen der Gastroenterologie lässt sich damit erklären, dass Patienten mit *Clostridium difficile* teilweise gezielt auf diese Station verlegt wurden. Die erhöhte Patientenzahl von onkologischen Stationen unterstützt die Annahme, dass onkologische Erkrankungen und spezielle onkologische Therapien wie Chemotherapie und Radiatio Risikofaktoren für eine CDI darstellen. Das Risiko, sich mit *Clostridium difficile* zu infizieren steigt mit zunehmendem Alter an. In einer Studie von Sunshine und McDonald (2006) wurde ein erhöhtes Risiko einer CDI Erkrankung ab 65 Jahren beschrieben und Pepin et al. (2005) wiesen eine erhöhte Rückfallrate an CDI nach Metronidazol und Vancomyzin Therapie bei Personen über 65 Jahren nach, was unter anderem an einem niedrigeren Antikörpertiter gegen Toxin A in dieser Altersgruppe liegt (Kyne et al., 2001). Die Ergebnisse in dieser Studie bezüglich der Altersverteilung der Patienten entsprachen ebenfalls der Annahme, dass ein Lebensalter älter 65 Jahre mit einem steigenden Risiko an CDI zu erkranken einhergeht. So waren von 167 Patienten 110 (64,3%) Patienten über 65 Jahre alt.

5.8 Quantifizierung von *Clostridium difficile* aus klinischen Umgebungsproben

Infektionen mit nosokomialen Erregern haben in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Ein großes Problem beim Umgang mit nosokomialen Infektionen ist, dass viele nosokomialen Erreger auf diversen Oberflächen der Patientenumgebung Tage bis Monate persistieren und auf diesem Wege leicht auf andere Patienten übertragen werden können. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Kontamination von Oberflächen durch die Hände von Patienten und Personal (Bures et al., 2000; Laborde et al., 1993). Die Persistenz der Erreger auf Oberflächen wird durch bestimmte Faktoren, wie z.B. eine niedrige Temperatur von 4-6°C, Nässe und eine hohe Erregerdichte auf der Oberfläche begünstigt (Kramer et al., 2006). Eine wichtige Eigenschaft von *Clostridium difficile* ist die Fähigkeit zur Sporenbildung. Die Sporen werden von infizierten Patienten mit dem Stuhl ausgeschieden und können monatelang auf Oberflächen in der Klinikumgebung persistieren wenn sie nicht mit einem sporenabtötenden Desinfektionsmittel entfernt werden. Erschwerend kommt hinzu, dass die Sporen eine hohe Resistenz gegen Umwelteinflüsse aufweisen und gegen herkömmliche alkoholische Desinfektionsmittel weitgehend unempfindlich sind. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Umgebung von infizierten Patienten stärker mit Sporen kontaminiert war als die Umgebung von asymptomatischen Trägern (Gerding et al., 1995). Gerade der hochvirulente Stamm Nap1/027 scheint im Vergleich zu anderen *Clostridium difficile* Stämmen deutlich mehr Sporen zu bilden, was zu seiner weiten Verbreitung beiträgt (Akerlund et al., 2008). In verschiedenen Studien wurde bereits die Kontamination der Umgebung von *Clostridium difficile* infizierten Patienten untersucht (Kaatz et al., 1988; Wilcox et al., 2000; Dubberke et al., 2007). Roberts et al. (2008) gelang es, *Clostridium difficile* Sporen aus der Luft zu kultivieren, sie konnten auf diese Weise 53-426 KBE/m³ Luft nachweisen. In den bereits veröffentlichten Studien wurden die *Clostridium difficile*-Sporen auf Platten kultiviert und dann über PCR-Methoden identifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 531 Umgebungsproben aus der Umgebung von Patienten des Universitätsklinikums Marburg abgenommen, die DNA aus den aufgenommenen Sporen über die Phenol-Chloroform Methode extrahiert und dann mit Hilfe eines Real-time-PCR Assays auf die Anwesenheit von *Clostridium difficile* hin getestet. Um zu untersuchen, ob die direkte Umgebung von aktuell infizierten Patienten stärker kontaminiert ist als von nicht infizierten Patienten wurden drei unterschiedliche Patientengruppen untersucht: aktuell infizierte Patienten, nicht

infizierte Patienten auf Stationen mit *Clostridium difficile*-Patienten und Patienten von Stationen auf denen seit 6 Monaten keinen *Clostridium difficile*-Fall mehr nachgewiesen worden war. Der zeitliche Abstand von 6 Monaten war insofern bedeutsam, da davon ausgegangen wird, dass die Sporen maximal 5 Monate in der Umwelt persistieren (Kim et al., 1981). Es wurden jeweils die Hände von Patienten und des Personals sowie Proben von diversen Oberflächen untersucht. Von den Umgebungsproben infizierter Patienten waren 43,6% der Proben positiv, unter den Umgebungsproben *Clostridium difficile*-negativer Patienten, die mit *Clostridium difficile*-infizierten Patienten auf Stationen lagen wurde in 53,5% der Proben *Clostridium difficile* detektiert und auf den Stationen, auf denen seit 6 Monaten kein *Clostridium difficile* mehr aufgetreten war, konnte in 25,9% der Proben *Clostridium difficile* nachgewiesen werden. Der Prozentsatz positiv getesteter Proben aus der Umgebung infizierter Patienten lag höher als die publizierten Prävalenzen in anderen Studien. Kaatz et al. (1988) konnten eine Inzidenz von 31% *Clostridium difficile* in der Umgebung von CDI Patienten nachweisen, Wilcox et al. (2003) detektierten *Clostridium difficile* in 35% der abgenommenen Umgebungsproben. Der Grund für den in der vorliegenden Studie höheren Prozentsatz positiver Proben lag vermutlich in der höheren Sensitivität der hier eingesetzten Real-time-PCR im Vergleich zum kulturellen Nachweis. Interessanterweise wurden aus der Umgebung *Clostridium difficile*-negativer Patienten die mit CDI-Patienten auf einer Station lagen ein höherer Prozentsatz an Proben positiv getestet als aus der Umgebung infizierter Patienten. Ursache könnte sein, dass die Isolations- und Hygienemaßnahmen nicht strikt genug befolgt wurden und so die Sporen durch das Personal auf der Station verteilt wurden. Im Gegensatz zu den Zimmern mit CDI-Patienten erfolgt in den anderen Zimmern der Station keine sporozide Scheuer-Wisch Desinfektion, wodurch die Sporen sich ansammeln können, zumal wenn eine Station öfters CDI-Patienten versorgt. Auch asymptomatische Träger können die Ursache sein. Der doch recht hohe Prozentsatz von 25,9% positiven Proben aus der Umgebung von Patienten von Stationen die seit 6 Monaten keinen CDI Fall mehr hatten, kann einerseits durch asymptomatische Träger als auch durch Übertragung durch das Personal von anderen Stationen erklärt werden. Bezüglich der gefundenen Zellzahlen in den Umgebungsproben der drei unterschiedlichen Patientengruppen konnte gezeigt werden, dass in den Proben vom Fußboden und der näheren Umgebung der *Clostridium difficile*-negativen Patienten von negativen Stationen signifikant weniger Zellzahlen nachgewiesen wurden als in den entsprechenden Proben der

Umgebung infizierter Patienten. Geht man davon aus, dass ein Teil der positiv getesteten Proben aus der Umgebung negativer Patienten negativer Stationen durch asymptomatische Träger verursacht wurde, war dieses Ergebnis insofern zu erwarten, da asymptomatische Träger weniger Sporen ausscheiden als infizierte Personen (Gerding et al., 1995). Auffallend war das Ergebnis, dass außer bei den Proben vom Fußboden zwischen den Umgebungsproben der infizierten Patienten und den Proben von negativen Patienten, die mit infizierten Patienten auf einer Station lagen, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellzahlen gefunden wurden. Das bedeutet, dass die Sporenanzahl außer auf dem Fußboden auf der restlichen Station vergleichbar groß ist wie im Patientenzimmer selber. Die Konsequenz daraus müsste eigentlich sein, dass nicht nur das eigentliche Patientenzimmer den besonderen Hygienemaßnahmen unterzogen werden muss, sondern auch der Rest der Station, da die Sporen anscheinend in der Zeit von Symptombeginn bis zur Diagnosestellung einer CDI schon auf der ganzen Station verteilt werden. Die weite Verbreitung der Sporen auf den Stationen machte zudem deutlich, wie wichtig eine möglichst schnelle Diagnosestellung ist, denn je später eine *Clostridium difficile*-Erkrankung diagnostiziert wird, desto länger stellt der betroffene Patient eine Verbreitungsquelle dar.

5.9 Bedeutung von Händehygiene und Präventionsmaßnahmen

Um herauszufinden inwiefern sich die verschiedenen Abstrichorte gegenseitig bedingen und in Zusammenhang stehen, wurde eine Korrelationsanalyse der Zellzahlen der unterschiedlichen Abstrichorte durchgeführt. Auffallend war, dass die Proben von Händen des Personals als einzige mit allen andern Abstrichorten korrelierten, was dafür spricht, dass Handkontakt der Hauptübertragungsweg der Sporen darstellt. Auch die Proben von Patientenhänden zeigten starke Korrelationen mit anderen Abstrichorten. Die Probe mit der höchsten gefundenen Zellzahl unter den Umgebungsproben war eine Probe von der Hand eines Patienten mit einer Zellzahl von $6,1 \times 10^4$ Zellen/ml. Die Proben von Händen des Personals zeigten ebenso erschreckend hohe Kontaminationen von bis zu $5,3 \times 10^4$ Zellen/ml. Allerdings konnten in manchen Hand-Proben auch gar keine Sporen nachgewiesen werden. An CDI erkrankte Patienten sind unter anderem dadurch charakterisiert, dass sie eine große Anzahl bakterieller Sporen ausscheiden. Die Sporen persistieren in der Umwelt und können in der Patientenumgebung nachgewiesen werden (Kaatz et al., 1988; Dubberke et al., 2007). Problematisch ist, dass die Sporen

von Patient zu Patient über direkten Kontakt weitergetragen werden können und dass das für die Pflege der CDI-Patienten verantwortliche Pflegepersonal ebenfalls an den Händen mit den Sporen kontaminiert ist, wobei die Kontamination der Pflegepersonalhände mit der Kontamination der Umgebung korreliert (Samore et al., 1996). Eine effektive Händehygiene stellt somit eine der wichtigsten Maßnahmen dar, um die Ausbreitung nosokomialer Keime zu verhindern (Larson et al., 1998; Nystrom et al., 1994). Im Falle einer aufgetretenen CDI müssen sowohl das Pflegepersonal als auch der betroffene Patient strikte Hygieneregeln zu Händereinigung einhalten. Anders als bei nicht Sporen bildenden Organismen wird zuerst die Händedesinfektion mit einem alkoholischen Desinfektionsmittel und anschließend die mechanische Reinigung mit Wasser und Seife empfohlen, wobei die mechanische Reinigung besonders zur Sporenentfernung von Bedeutung ist (AWMF-Leitlinien-Register Nr. 029/027). Die Bettwäsche von an CDI- Erkrankten sollte jeden Tag gewechselt werden, da angenommen wird, dass die nähere Umgebung des Patienten besonders mit Sporen kontaminiert ist. In dieser Arbeit wurde als nähere Umgebung alle Gegenstände und Oberflächen im Umkreis von <1m zum Patient festgelegt. Speziell auf Baumwolloberflächen wie Decken und Kissenbezügen konnte teilweise eine hohe Sporenanzahl detektiert werden. Die höchste Zellzahl war dabei in einer Probe von der Bettdecke eines Intensivpatienten mit $2,7 \times 10^4$ Zellen/ml nachgewiesen worden. Zu den erforderlichen Hygienemaßnahmen bei *Clostridium difficile*-Erkrankungen gehört eine spezielle Fußboden- und Zimmerreinigung mit einem sporoziden Desinfektionsmittel, da die herkömmlichen nicht Aldehyd-Desinfektionsmittel zur Entfernung der Sporen ungeeignet sind. Zur Auswahl stehen dazu verschiedene Desinfektionsmittel auf Aldehydbasis wie zum Beispiel Buraton 10F (Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland). In der vorliegenden Studie wurden die Umgebungsproben vor der *Clostridium difficile*-spezifischen Zimmerreinigung abgenommen um eine authentische Vorstellung von der Sporenverteilung zu bekommen. Anhand der gefundenen Zellzahlen auf hygienisch relevanten Oberflächen im Patientenzimmer ließ sich feststellen, dass die regulär durchgeführte Standardzimmerreinigung definitiv nicht zur Sporenentfernung ausreichte. Die hohe Kontamination der unterschiedlichsten Gegenstände und Oberflächen im Patientenzimmer zeigte außerdem, dass sich die Reinigung nicht nur auf das Wischen von Fußboden und Tisch beschränken sollte, sondern auf alle Gegenstände und Oberflächen ausgedehnt werden muss, mit denen der Patient und das Pflegepersonal in Kontakt kommen.

6. Tabellen

Tab.8: Positive Stuhlproben

Proben Nr.	w/m	Geburtsdatum	Station	Ct-Wert	Zellen/ml	Zellen/g Stuhl	Toxin A	Toxin B	Binary-toxin
1	w	03.06.1928	331	22,12	3,08E+06	1,23E+09	+	+	-
2	w	03.06.1928	331	23,38	1,45E+06	5,80E+08	+	+	-
3	w	24.05.1921	124	21,84	3,65E+06	1,46E+09	+	+	-
4	w	03.06.1928	331	21,53	4,38E+06	1,75E+09	+	+	-
5	m	01.07.1917	137	29,17	4,50E+04	1,80E+07	+	+	-
6	w	14.05.1932	225	21,07	5,79E+06	2,31E+09	+	+	-
7	m	16.09.1923	18	22,97	1,85E+06	7,39E+08	+	+	-
8	w	17.01.1932	125	22,98	1,84E+06	7,35E+08	+	+	-
9	w	11.08.1926	0 21	21,22	5,29E+06	2,12E+09	+	+	-
10	w	11.08.1926	0 21	22,95	1,88E+06	7,50E+08	+	+	-
11	w	15.07.1930	221	19,61	1,39E+07	5,55E+09	+	+	-
12	m	30.03.1963	0 21	30,65	1,86E+04	7,44E+06	+	+	-
13	w	15.07.1930	221	18,15	3,33E+07	1,33E+10	+	+	-
14	m	24.01.2002	15	24,57	7,08E+05	2,83E+08	+	+	-
15	m	29.05.1924	133	22,43	2,55E+06	1,02E+09	+	+	+
16	m	13.07.1950	331	20,73	7,09E+06	2,84E+09	+	+	-
17	w	17.03.1978	0 21	31,54	1,09E+04	4,35E+06	+	+	-
18	w	25.04.1930	331	34,84	1,50E+03	6,02E+05	+	+	-
19	w	27.10.1999	15	30,63	1,88E+04	7,50E+06	+	+	-
20	w	25.04.1930	331	34,20	2,22E+03	8,86E+05	+	+	-
21	m	05.04.1921	331	22,38	2,63E+06	1,05E+09	+	+	-
22	w	22.11.1940	139	33,90	2,64E+03	1,06E+06	+	+	-
23	m	20.05.1934	138	28,23	7,90E+04	3,16E+07	+	+	-
24	m	30.05.1936	18	34,43	1,92E+03	7,70E+05	-	-	-
25	m	24.08.1937	13	34,96	1,40E+03	5,62E+05	-	-	-
26	m	07.02.1953	18	36,73	4,86E+02	1,95E+05	-	-	-
27	m	22.05.1958	138	29,72	3,25E+04	1,30E+07	-	-	-
28	m	31.03.1956	331	30,01	2,72E+04	1,09E+07	-	+	-
29	m	02.08.1941	138	29,32	4,11E+04	1,64E+07	+	+	-
30	m	21.12.1949	18	21,56	4,31E+06	1,73E+09	+	+	-
31	w	30.04.1922	222	27,15	1,51E+05	6,04E+07	-	+	-
32	m	23.05.1925	0 21	25,19	4,88E+05	1,95E+08	+	+	-
33	m	24.08.1937	13	34,76	1,58E+03	6,33E+05	-	-	-
34	w	13.06.1969	224	33,29	3,81E+03	1,52E+06	+	-	-
35	m	24.08.1937	13	33,89	2,67E+03	1,07E+06	+	-	-
36	m	07.10.1936	13	18,80	2,25E+07	9,02E+09	+	+	-
37	w	22.09.1935	0 22	22,09	3,13E+06	1,25E+09	-	-	-
38	m		15	24,98	5,54E+05	2,22E+08	+	+	-
39	w	13.04.1971	223	21,57	4,27E+06	1,71E+09	+	+	-
40	w	14.05.1943	CHD	24,42	7,75E+05	3,10E+08	+	+	-
41	w	22.11.1940	139	36,00	7,51E+02	3,00E+05	+	+	-
42	w	04.07.1919	137	26,78	1,88E+05	7,54E+07	-	+	-
43	m	09.02.1922	124	23,31	1,51E+06	6,03E+08	+	+	-
44	w	22.09.1935	0 22	23,06	1,75E+06	7,00E+08	-	-	-
45	w	24.08.1922	136	26,73	1,94E+05	7,77E+07	-	+	-
46	w	14.05.1943	CHD	22,58	2,34E+06	9,36E+08	+	+	-

47	m	24.08.1937	I3	32,12	7,70E+03	3,08E+06	-	-	-
48	m	23.05.1925	0 21	21,73	3,90E+06	1,56E+09	+	+	-
49	m	10.02.1940	134	29,29	4,20E+04	1,68E+07	-	-	-
50	w	10.02.1929	0 22	25,28	4,63E+05	1,85E+08	-	+	-
51	m	14.12.1933	126	32,63	5,66E+03	2,26E+06	-	-	-
52	m	04.07.1931	0 21	24,49	7,45E+05	2,98E+08	+	+	-
53	m	24.08.1937	I3	34,60	1,74E+03	6,95E+05	-	-	-
54	w	14.05.1943	CHD	20,36	8,83E+06	3,53E+09	+	+	-
55	m	17.12.1928	122	20,60	7,67E+06	3,07E+09	+	+	-
56	w	14.05.1943	CHD	22,95	1,87E+06	7,48E+08	-	+	-
57	m	04.07.1931	0 21	25,47	4,14E+05	1,66E+08	-	+	-
58	m	14.12.1933	223	19,22	1,75E+07	7,01E+09	+	+	-
59	m	14.12.1933	126	24,21	8,81E+05	3,53E+08	+	+	-
60	m	02.06.1934	122	20,59	7,71E+06	3,09E+09	+	+	-
61	w	26.05.1934	I2	18,32	3,00E+07	1,20E+10	+	+	-
62	w	28.12.1933	124	24,55	7,17E+05	2,87E+08	+	+	-
63	m	09.02.1955	AMCH	20,08	1,04E+07	4,18E+09	+	+	-
64	m	26.05.1985	222	32,64	5,64E+03	2,26E+06	-	-	-
65	m	07.02.1953	223	20,49	8,17E+06	3,27E+09	+	+	-
66	w	28.12.1933	0 21	24,16	9,06E+05	3,62E+08	-	+	-
67	w	14.05.1943	CHD	24,74	6,42E+05	2,57E+08	+	+	-
68	w	14.05.1943	CHD	20,40	8,62E+06	3,45E+09	+	+	-
69	m	01.08.1935	137	22,11	3,10E+06	1,24E+09	+	+	-
70	w	25.06.1925	131	23,67	1,22E+06	4,87E+08	+	+	-
71	w	27.10.1999	I5	26,27	2,57E+05	1,03E+08	-	+	-
72	w	04.07.1919	138	24,49	7,43E+05	2,97E+08	+	+	-
73	m	19.06.1938	331	20,73	7,07E+06	2,83E+09	-	+	-
74	w	21.05.1924	I1	17,9	3,85E+07	1,54E+10	+	+	-
75	w	15.10.1938	225	37,34	3,36E+02	1,34E+05	-	+	-
76	w	13.06.1959	221	28,445	6,93E+04	2,77E+07	+	+	-
77	m		Zahn	19,67	1,33E+07	5,32E+09	+	+	-
78	w	18.05.1931	225	26,335	2,46E+05	9,84E+07	+	+	-
79	m	10.01.1937	236	40, 00	6,83E+01	2,73E+04	+	+	-
80	w	07.08.2000	0 41	19, 935	1,14E+07	4,56E+09	+	+	-
81	w	22.08.1923	139	25,13	5,06E+05	2,02E+08	+	+	-
82	m	30.08.1987	I3	28, 8	5,62E+04	2,24E+07	-	+	-
83	m	08.02.1945	I4	24, 1	9,39E+05	3,97E+08	+	+	-
84	w	05.09.1983	0 22	28, 705	5,96E+04	2,38E+07	-	+	-
85	m	21.02.1925	0 21	16, 63	8,40E+07	3,22E+10	+	+	-
86	m	07.09.1956	223	19, 185	1,78E+07	7,12E+09	+	+	-
87	w		I1	15, 66	1,48E+08	5,92E+10	+	+	-
88	w	05.09.1983	0 22	28, 46	6,88E+04	2,72E+07	+	+	-
89	m	07.09.1956	223	19, 79	1,24E+07	4,96E+09	+	+	-
90	w	05.09.1983	0 22	31, 45	1,15E+04	4,60E+06	-	+	-
91	m	17.02.1931	135	19, 42	1,55E+07	6,20E+09	+	+	-
92	w	31.05.1920	Geriatric	20, 365	8,80E+06	3,52E+09	+	+	-
93	m	04.12.1938	122	21,2	5,34E+06	2,13E+09	+	+	-
94	w	30.03.1930	0 21	20, 505	8,09E+06	3,23E+09	+	+	-
95	w	27.08.1934	138	26, 09	2,85E+05	1,14E+08	-	+	-
96	w	06.05.1928	225	16, 125	1,12E+08	4,48E+10	+	+	-
97	w	29.04.1922	I3	18, 39	2,87E+07	1,15E+10	+	+	-
98	w	08.11.1937	0 21	17, 32	5,46E+07	9,84E+09	+	+	-
99	m	06.09.1921	0 22	17, 685	4,38E+07	1,75E+10	+	+	+

100	w	20.01.1930	I3	26, 145	1,91E+01	7,64E+03	+	+	-
101	w	27.08.1934	138	29, 38	3,97E+04	1,59E+07	-	+	-
102	w	13.03.1933	137	21, 30	5,03E+06	2,01E+09	+	+	-
103	w	21.11.1929	222	22, 93	1,89E+06	7,56E+08	+	+	+
104	m	02.12.1919	I1	15, 44	1,68E+08	6,72E+10	+	+	+
105	w	22.08.1923	Gyn	27, 335	1,35E+05	5,40E+07	+	+	-
106	m	02.12.1919	I1	15, 54	1,59E+08	6,36E+10	+	+	+
107	w	18.05.1911	0 21	16, 08	1,15E+08	4,60E+10	+	+	-
108	w	25.01.1927	0 21	20, 435	8,44E+06	3,38E+09	+	+	-
109	w	18.05.1911	0 21	17, 47	4,99E+07	1,97E+10	+	+	-
110	w	06.11.1948	224	29, 35	4,04E+04	1,62E+07	-	+	-
111	w	06.11.1948	224	28, 75	5,79E+04	2,32E+07	-	+	-
112	m	06.09.1921	0 22	17, 605	4,60E+07	1,84E+10	+	+	-
113	w	06.11.1948	224	29, 4	3,92E+04	1,57E+07	-	+	-
114	m	20.05.1926	133	17, 87	3,92E+07	1,57E+10	+	+	-
115	w	06.11.1952	139	24, 91	5,78E+05	2,31E+08	+	+	+
116	w	06.11.1952	139	24, 85	5,99E+05	2,34E+08	-	+	+
117	m	30.05.1929	225	21, 665	4,04E+06	1,62E+09	+	+	-
118	m	21.11.1932	222	17, 27	5,62E+07	2,25E+10	+	+	-
119	w	13.01.1941	224	19, 56	1,43E+07	5,72E+09	-	+	-
120	w	24.12.1919	I8	22, 22	2,90E+06	1,16E+09	+	+	-
121	w	06.05.1928	225	20, 045	1,07E+07	4,28E+09	+	+	-
122	w	13.01.1941	224	19, 135	1,84E+07	7,36E+09	+	+	-
123	w	13.01.1941	224	20, 13	1,01E+07	4,04E+09	-	+	-
124	m	04.06.1953	I4	27, 695	1,09E+05	4,36E+07	-	+	-
125	w	03.04.1925	0 22	29, 5	3,69E+04	1,48E+07	-	+	-
126	m	26.09.1950	224	21, 37	4,82E+06	1,93E+09	+	+	-
127	m	17.10.1936	0 22	20, 48	8,21E+06	3,28E+09	+	+	-
128	w	05.01.1931	0 22	18, 325	2,99E+07	1,19E+10	+	+	-
129	w	28.09.1977	224	27, 125	6,13E+07	2,45E+10	-	-	-
130	m	19.12.1935	Derma	14, 63	2,74E+08	1,09E+11	+	+	-
131	m	17.02.1931	135	15, 7	1,44E+08	5,76E+10	-	-	-
132	w	20.09.1921	0 22	27, 405	1,30E+05	5,20E+07	-	+	-
133	m	21.11.1932	222	23, 315	1,50E+06	6,00E+08	-	+	-
134	m	14.06.1940	135	27, 39	1,31E+05	5,24E+08	-	-	-
135	m	19.02.1918	0 21	26, 03	2,95E+05	1,18E+08	-	+	-
136	m	16.11.1925	133	21, 18	5,40E+06	2,16E+09	+	+	-
137	w	30.11.1920	225	15, 91	1,27E+08	5,08E+10	+	+	-
138	m	26.09.1950	224	30, 78	1,71E+04	6,84E+07	-	+	-
139	m	24.04.1952	I1	32, 465	6,25E+03	2,50E+06	-	+	-
140	m	06.09.1921	0 22	19, 13	1,84E+07	7,36E+09	+	+	-
141	m	17.10.1936	0 22	21, 82	3,68E+06	1,47E+09	-	+	-
142	w	30.03.1930	126	30, 395	2,16E+04	8,64E+07	-	+	-
143	m	22.05.1938	134	22, 66	2,22E+06	8,88E+08	+	-	-
144	w	10.06.1944	I5	18, 405	2,85E+07	1,14E+10	+	+	+
145	w	27.08.1923	331	20, 335	8,96E+06	3,58E+09	+	+	-
146	m	17.10.1936	22	17, 775	4,15E+07	1,66E+10	+	+	-
147	m	19.02.1939	331	33, 03	4,45E+03	1,78E+06	-	-	-
148	w	24.10.1936	122	33, 68	3,02E+03	1,21E+06	-	-	-
149	w	27.08.1923	331	18, 505	2,68E+07	1,07E+10	+	+	-
150	m	04.09.1954	135	17, 33	5,42E+07	2,17E+10	+	+	-
151	m	03.10.1919	235	17,645	4,49E+07	1,78E+10	+	+	-
152	w	05.01.1931	CHD	18,685	2,41E+07	9,64E+09	+	+	-

153	m	03.10.1919	235	20,68	7,29E+06	2,92E+09	+	+	-
154	w	14.07.1913	Geriatric	17,535	4,80E+07	1,92E+10	+	+	-
155	w	01.12.1922	235	22,1	3,11E+06	1,24E+09	+	+	-
156	w	10.07.1974	235	33,585	3,19E+03	1,28E+06	+	-	-
157	w	01.12.1922	235	23,15	1,66E+06	6,64E+09	+	+	-
158	w	08.11.1937	0 21	15,58	1,55E+08	6,20E+10	-	-	-
159	w	15.10.1938	331	20,415	8,54E+06	3,42E+09	+	+	+
160	m	30.03.1936	223	25,88	3,23E+05	1,29E+08	+	-	-
161	w	24.05.1944	125	18,86	2,17E+07	8,68E+09	+	+	-

Tab.9: Negative Stuhlproben

Proben Nr.	w/m	Geburtsdatum	Station	Ct-Wert	Zellen/ml	Zellen/g Stuhl	Toxin A	Toxin B	Binary toxin
1	m	30.08.1932	225	26,88	1,77E+05	7,08E+07	-	-	-
2	w	02.03.1927	138	22,11	3,09E+06	1,24E+09	+	+	+
3	w	18.05.1911	122	35,625	9,40E+02	3,76E+05	-	-	-
4	w	12.03.1945	224	34,18	2,24E+03	8,96E+05	-	-	-
5	m	12.03.1945	AMCH	33,52	3,32E+03	1,33E+06	-	-	-
6	w	08.11.1937	0 21	22,81	2,03E+06	8,12E+09	+	+	-
7	w	26.01.1938	DI	37,49	3,08E+02	1,23E+05	-	-	-
8	w	26.08.1982	I5	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
9	w	08.01.1922	0 21	22,62	2,28E+06	9,12E+09	-	-	-
10	m	02.07.1941	135	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
11	w	05.04.1922	DI	33,4	3,57E+03	1,43E+06	-	-	-
12	m	25.10.1987	PULT	20,415	8,54E+06	3,42E+09	+	+	-
13	m	18.03.1957	PUKL	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
14	m	23..1941	0 22	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
15	w	21.01.1924	0 22	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
16	w	08.01.1922	0 21	22,354	2,69E+06	1,08E+09	-	-	-
17	w	28.05.1944	0 22	36,03	7,38E+02	2,95E+05	-	-	-
18	m	05.03.1938	0 21	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
19	m	05.03.1938	0 21	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
20	m	19.12.1935	DERF	32,12	7,68E+03	3,07E+06	-	-	-
21	w	28.11.1936	0 22	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
22	w	28.11.1936	0 22	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
23	w	03.06.1926	222	39,02	1,23E+02	4,92E+04	-	-	-
24	m	09.08.1959	PUKL	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
25	m	09.08.1959	PUKL	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
26	m	01.11.1983	DERf	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
27	m	13.02.1950	124	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
28	m	02.11.1989	PUKL	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
29	m	05.03.1938	0 21	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
30	w	18.08.2006	00 7NI	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
31	w	17.05.1925	DI	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
32	w	16.09.1964	0 21	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
33	w	06.04.1960	331	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
34	w	26.09.1942	224	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
35	w	23.06.1934	225	35,585	9,63E+02	3,85E+05	-	-	-
36	w	26.09.1942	224	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
37	m	12.05.1945	225	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
38	w	26.09.1942	224	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
39	m	19.02.1985	0 21	34,92	1,43E+03	5,72E+05	-	-	-

40	m	12.04.1927	DI	24,21	8,79E+05	3,51E+09	+	+	-
41	m	19.02.1985	0 21	36,45	5,74E+02	2,29E+05	-	-	-
42	m	26.09.1950	224	29,31	4,14E+04	1,66E+07	-	-	-
43	m	26.09.1950	224	30,41	2,14E+04	8,56E+06	-	-	-
44	m	05.11.1939	133	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
45	m	21.02.1925	0 21	32,37	6,61E+03	2,73E+04	-	-	-
46	m	31.12.1945	225	36,575	5,32E+02	2,13E+05	-	-	-
47	m	28.05.1933	DI AW	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
48	w	08.05.1918	DI AW	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
49	m	24.02.1921	133	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
50	m	07.06.1976	224	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
51	m	12.11.1945	133	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
52	m	03.07.1965	0 21	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
53	w	06.04.1960	331	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
54	m	04.07.1930	0 21	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
55	m	02.02.1942	0 21	37,27	3,51E+02	1,40E+05	-	-	-
56	m	02.02.1942	0 21	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
57	m	19.01.1968	224	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
58	m	10.03.1954	137	27,13	1,53E+05	6,12E+07	-	+	-
59	w	16.06.1957	331	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
60	w	16.06.1957	331	35,83	8,32E+02	3,32E+05	-	-	-
61	w	02.11.1952	133	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
62	m	30.11.1939	I5	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
63	w	19.04.1932	0 21	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
64	m	20.05.1926	133	30,155	2,49E+04	9,96E+06	-	+	-
65	w	18.12.1940	139	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
66	w	18.12.1940	139	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
67	m	21.11.1952	222	33,834	2,75E+03	1,10E+06	-	-	-
68	m	11.01.1950	I8	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
69	w	18.12.1940	139	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
70	w	21.05.1924	I3	23,265	1,55E+06	6,20E+09	-	+	-
71	w		225	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
72	m	02.02.1942	0 21	35,138	1,23E+03	4,92E+05	-	-	-
73	m	04.06.1965	225	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
74	w		225	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
75			225	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
76	m	01.06.1962	0 21	28,695	5,98E+04	2,39E+07	-	+	-
77	w	03.07.1925	331	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
78	m	01.06.1962	0 21	28,2	8,05E+04	3,22E+07	-	+	-
79	w	14.02.1973	224	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
80	m	23.03.1943	134	40	6,83E+01	2,73E+04	-	-	-
81	m	05.01.1925	138	23,855	1,09E+06	4,36E+08	-	-	-

Tab.10: Umgebungsproben

Stationstyp: 0 = Chirurgie

1 = Innere Medizin

2 = Intensivstation

Status: 0 = Positiv getesteter Patient

1 = Negative Patienten die mit einem Positivem Patienten auf einer Station liegen

2 = Negative Patienten auf Stationen auf denen seit 6 Monaten kein *Clostridium difficile* mehr nachgewiesen wurde

id	Stations-Nr.	Stations-Typ	Status	Fußboden	Patienten-Hände	Personal-Hände	Näh. Umgeb.	Entf. Umgeb.
1	225	0	0	4,75E+04	5,83E+03	1,22E+04	1,20E+04	7,28E+03
1	225	0	0				3,63E+03	4,22E+03
1	225	0	0					2,31E+04
1	225							2,04E+04
2	225	0	0		1,96E+04		6,83E+01	6,83E+01
2	225	0	0				4,22E+03	6,83E+01
3	126	0	0		2,29E+04		1,83E+04	1,65E+04
3	126	0	0				1,85E+04	5,79E+04
4	126	0	0			6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
4	126	0	0				6,83E+01	6,83E+01
4	126	0	0				6,83E+01	
4	126	0	0				6,83E+01	
4	126	0	0				6,83E+01	
5	125	0	0		6,83E+01	6,83E+01	1,29E+03	6,83E+01
5	125	0	0			8,27E+02		6,83E+01
5	125	0	0					6,04E+03
6	125	0	0	6,51E+03	6,83E+01	6,83E+01	1,30E+03	2,06E+03
6	125	0	0	1,23E+03				3,97E+03
6	125	0	0					1,83E+03
7	226	0	0	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
7	226	0	0		6,83E+01			
8	138	0	0	6,83E+01	6,83E+01		6,83E+01	6,83E+01
8	138	0	0					6,83E+01
8	138	0	0					6,83E+01
8	138	0	0					6,83E+01
8	138	0	0					6,83E+01
8	138	0	0					6,83E+01
8	138	0	0					6,83E+01
8	138	0	0					6,83E+01
8	138	0	0					6,83E+01
9	139	0	0	3,74E+04	6,09E+04	5,43E+03		
9	139	0	0	6,00E+04		6,53E+03		
9	139	0	0			6,50E+02		
10	134	0	0		6,83E+01			6,83E+01
10	134	0	0		6,83E+01			

11	235	0	0		6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
11	235	0	0					6,83E+01
11	235	0	0					6,83E+01
11	235	0	0					8,87E+03
11	235	0	0					1,65E+04
12	I2	2	0		6,83E+01	5,90E+03	6,83E+01	6,83E+01
12	I2	2	0				6,83E+01	6,83E+01
12	I2	2	0				6,83E+01	6,83E+01
13	I2	2	0	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
13	I2	2	0	6,83E+01			6,83E+01	
13	I2	2	0				6,83E+01	
13	I2	2	0				6,83E+01	
14	I2	2	0				5,40E+02	
14	I2	2	0				6,83E+01	
14	I2	2	0				6,83E+01	
15	I4	2	0	4,28E+02	6,83E+01		2,66E+04	6,83E+01
15	I4	2	0					3,92E+04
15	I4	2	0					8,20E+03
15	I4	2	0					6,83E+01
16	I5	2	0	1,46E+03	7,34E+03		6,83E+01	2,37E+03
16	I5	2	0				6,83E+01	6,39E+02
16	I5	2	0					6,83E+01
16	I5	2	0					6,83E+01
17	124	1	0		6,83E+01	6,83E+01	3,63E+03	6,83E+01
17	124	1	0			4,08E+03	6,83E+01	3,76E+03
18	124	1	0	6,83E+01	6,83E+01		6,83E+01	
19	124	1	0				5,16E+02	
20	0 22	1	0	6,83E+01			1,60E+04	5,63E+02
20	0 22	1	0	5,42E+04				
21	0 22	1	0					6,83E+01
21	0 22	1	0					6,83E+01
22	0 21	1	0					6,83E+01
23	0 21	1	0		6,83E+01		6,83E+01	6,83E+01
23	0 21	1	0				6,83E+01	4,53E+02
23	0 21	1	0				6,83E+01	6,83E+01
23	0 21	1	0					5,18E+02
24	0 21	1	0				6,83E+01	
25	0 22	1	0	6,83E+01	6,83E+01		6,83E+01	6,83E+01
25	0 22	1	0		6,83E+01		6,83E+01	6,83E+01
25	0 22	1	0				6,83E+01	6,83E+01
25	0 22	1	0				6,83E+01	
25	0 22	1	0				6,83E+01	
25	0 22	1	0				6,83E+01	
25	0 22	1	0				6,11E+02	
26	0 22	1	0	6,83E+01	6,83E+01		6,83E+01	6,83E+01
26	0 22	1	0				6,83E+01	6,83E+01
26	0 22	1	0				6,83E+01	6,83E+01
26	0 22	1	0				6,83E+01	
26	0 22	1	0				6,83E+01	
27	0 21	1	0		6,83E+01		2,02E+02	6,83E+01
27	0 21	1	0		6,83E+01		6,83E+01	6,83E+01
27	0 21	1	0		6,83E+01		6,83E+01	
28	123	1	0		6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01

28	123	1	0			6,83E+01	6,83E+01	9,92E+02
28	123	1	0			6,83E+01	6,83E+01	
29	331	1	0	6,83E+01	5,18E+02			6,83E+01
30	122	1	0		4,86E+03	2,26E+03	3,90E+03	6,83E+01
30	122	1	0					1,87E+03
31	CHD	1	0	2,91E+03			1,18E+03	1,53E+03
31	CHD	1	0	5,26E+04				5,28E+03
31	CHD	1	0					6,83E+01
31	CHD	1	0					6,29E+02
32	223	1	0	1,60E+04	5,29E+04	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
32	223	1	0		6,83E+01	3,86E+03	6,83E+01	2,68E+04
32	223	1	0				1,95E+03	1,14E+03
32	223	1	0					6,83E+01
33	I2	2	1	6,83E+01			6,83E+01	2,02E+03
33	I2	2	1					4,78E+04
34	I2	2	1	6,83E+01	6,83E+01	2,74E+03	6,83E+01	
34	I2	2	1	2,46E+03	2,28E+03	2,58E+03	6,83E+01	
34	I2	2	1	2,60E+03	1,66E+03	6,83E+01	1,25E+03	
34	I2	2	1		3,98E+03		6,83E+01	
34	I2	2	1		6,83E+01			
35	0 39	0	1	6,83E+01	6,83E+01		8,17E+02	6,83E+01
35	0 39	0	1	1,79E+03	6,83E+01		6,83E+01	1,95E+03
35	0 39	0	1	9,04E+02	3,63E+03		1,14E+03	6,83E+01
35	0 39	0	1	7,03E+02	6,83E+01		6,83E+01	6,83E+01
35	0 39	0	1	1,16E+04	2,04E+03		6,83E+01	1,04E+03
35	0 39	0	1	6,83E+01			3,33E+03	1,73E+03
35	0 39	0	1				1,30E+03	2,39E+03
35	0 39	0	1				1,27E+03	1,64E+03
35	0 39	0	1				1,68E+03	1,63E+03
35	0 39	0	1				6,83E+01	6,83E+01
35	0 39	0	1				6,83E+01	6,83E+01
35	0 39	0	1				2,08E+03	8,76E+03
35	0 39	0	1				1,82E+03	3,63E+03
35	0 39	0	1				1,30E+03	6,83E+01
35	0 39	0	1				3,65E+03	2,14E+03
35	0 39	0	1				3,73E+03	1,20E+03
35	0 39	0	1					6,83E+01
35	0 39	0	1					6,83E+01
35	0 39	0	1					2,01E+03
35	0 39	0	1					6,83E+01
35	0 39	0	1					5,22E+03
35	0 39	0	1					4,36E+03
36	137	0	1	1,81E+03	6,83E+01	8,22E+02	2,79E+03	1,19E+03
36	137	0	1				2,46E+02	5,87E+03
36	137	0	1					1,25E+03
37	235	0	1		4,56E+03			1,61E+04
38	225	0	1	6,83E+01				6,83E+01
38	225	0	1					
38	225	0	1					
39	125	0	1				2,32E+03	6,83E+01
39	125	0	1					1,90E+03
39	125	0	1					4,00E+03

39	139	0	1	6,83E+01	1,21E+03	6,83E+01	1,88E+03	
39	139	0	1	6,83E+01	1,97E+03	4,16E+03	1,21E+03	
39	139	0	1	6,83E+01	1,88E+03		3,70E+03	
39	139	0	1		1,91E+03		2,98E+03	
39	139	0	1				1,52E+03	
39	139	0	1				1,72E+03	
40	124	1	1		8,35E+03	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
40	124	1	1			6,83E+01		6,83E+01
41	122	1	1					
42	CHD	1	1					
43	223	1	1		9,25E+03		6,83E+01	6,83E+01
43	223	1	1		6,80E+02		6,83E+01	
43	223	1	1				7,88E+02	
44	I4	2	1		6,83E+01	4,62E+02	7,42E+02	6,83E+01
45	I5	2	1	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
45	I5	2	1			6,83E+01		6,83E+01
45	I5	2	1					4,26E+02
46	224	1	1	4,17E+03	9,60E+02	6,83E+01	1,17E+03	2,54E+03
46	224	1	1	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	2,21E+03
46	224	1	1				6,83E+01	1,92E+03
46	224	1	1				3,24E+03	6,83E+01
46	224	1	1					1,41E+03
46	224	1	1					6,18E+02
46	224	1	1					3,14E+03
46	224	1	1					3,01E+02
46	224	1	1					1,03E+03
46	224	1	1					2,50E+03
46	224	1	1					1,53E+03
46	224	1	1					6,83E+01
47	0 21	1	1		8,22E+02	1,35E+03	6,83E+01	6,83E+01
47	0 21	1	1		6,83E+01	4,38E+02		6,83E+01
47	0 21	1	1		6,83E+01	6,83E+01		6,83E+01
47	0 21	1	1		6,83E+01	7,88E+02		4,09E+02
47	0 21	1	1		5,34E+02	6,83E+01		
47	0 21	1	1		6,83E+01	7,16E+02		
47	0 21	1	1		3,22E+03			
47	0 21	1	1		6,83E+01			
48	237	0	2	6,83E+01	6,83E+01		6,83E+01	6,83E+01
48	237	0	2	6,83E+01				6,83E+01
48	237	0	2					6,83E+01
48	237	0	2					6,83E+01
49	238	0	2	4,81E+03	8,82E+03	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
49	238	0	2	3,50E+03		6,83E+01		6,83E+01
49	238	0	2					6,08E+03
49	238	0	2					5,46E+03
50	131	0	2	1,99E+02	1,77E+03		6,83E+01	6,83E+01
50	131	0	2	6,83E+01	6,83E+01		6,83E+01	1,17E+03
50	131	0	2				6,83E+01	6,83E+01
50	131	0	2				6,83E+01	6,83E+01
50	131	0	2				7,40E+02	
50	131	0	2				6,83E+01	
51	129	0	2	6,83E+01	6,57E+03	6,83E+01	1,80E+03	9,10E+02

51	129	0	2	2,14E+03	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
51	129	0	2				2,05E+03	6,83E+01
51	129	0	2				6,83E+01	6,83E+01
51	129	0	2				6,83E+01	6,83E+01
51	129	0	2				6,83E+01	6,96E+03
51	129	0	2					6,83E+01
51	129	0	2					6,83E+01
51	129	0	2					6,83E+01
52	142	0	2	9,60E+02	4,11E+03	2,73E+02	6,83E+01	6,83E+01
52	142	0	2	2,96E+03	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
52	142	0	2				1,80E+03	6,83E+01
52	142	0	2				6,83E+01	6,83E+01
52	142	0	2				6,83E+01	5,06E+03
52	142	0	2					4,67E+03
52	142	0	2					6,64E+02
52	142	0	2					9,26E+02
52	142	0	2					9,22E+01
52	142	0	2					6,83E+01
53	l6	2	2	2,12E+03	6,83E+01	6,83E+01	2,25E+03	1,02E+03
53	l6	2	2	6,83E+01	4,55E+03	2,10E+03	4,58E+02	1,48E+03
53	l6	2	2				6,83E+01	1,14E+03
53	l6	2	2				1,70E+03	8,32E+02
53	l6	2	2					6,83E+01
53	l6	2	2					1,90E+03
53	l6	2	2					6,83E+01
53	l6	2	2					6,83E+01
53	l6	2	2					6,83E+01
54	Kreisssaal	0	2	5,27E+02		6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
54	Kreisssaal	0	2				6,83E+01	6,83E+01
54	Kreisssaal	0	2					6,83E+01
54	Kreisssaal	0	2					3,84E+02
54	Kreisssaal	0	2					6,83E+01
54	Kreisssaal	0	2					6,83E+01
55	0 42	1	2	3,66E+02	1,01E+03	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
55	0 42	1	2				1,35E+03	1,95E+03
55	0 42	1	2					6,83E+01
55	0 42	1	2					6,83E+01
56	0 21	1	2		6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
56	0 21	1	2			6,83E+01		6,83E+01
56	0 21	1	2			6,83E+01		
57	l8	2	2	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
57	l8	2	2		6,83E+01		6,83E+01	
57	l8	2	2		6,83E+01		1,29E+03	
57	l8	2	2		6,83E+01			
57	223	1	2	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
57	223	1	2		6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	
57	223	1	2		6,83E+01		6,83E+01	
57	223	1	2		6,83E+01			
58	2 22	1	2	1,76E+03	1,62E+03	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01
58	2 22	1	2		1,96E+03	7,79E+02	2,66E+02	
58	2 22	1	2		6,83E+01		6,83E+01	
58	2 22	1	2		6,83E+01			
58	2 22	1	2		6,83E+01			

59	2 21	1	2	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	6,83E+01	
59	2 21	1	2		1,29E+03	6,83E+01	6,83E+01	
59	2 21	1	2		6,83E+01		6,83E+01	
59	2 21	1	2		6,83E+01			
59	2 21	1	2		9,83E+02			

7. Abbildungen

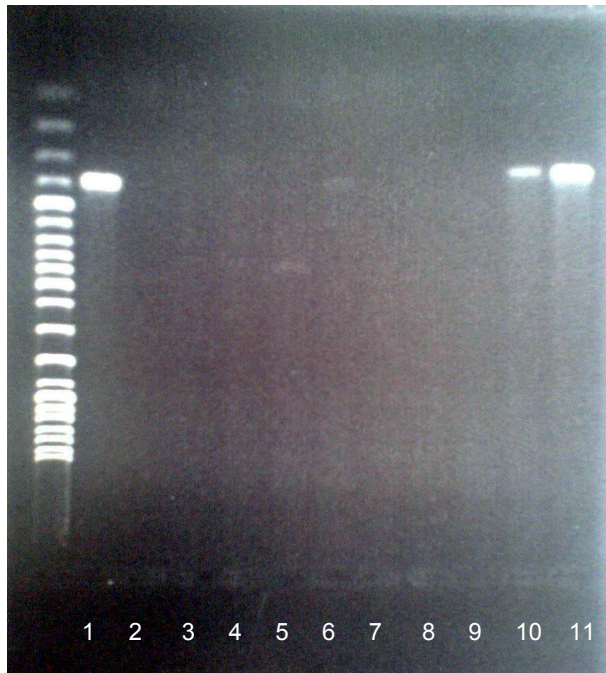


Abb. 5: Konventionelle PCR der im ELISA positiv getesteten Stuhlproben nach Binarytoxin (cdtA). Gelbeladung von links nach rechts: 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3-11: Probe 107-116

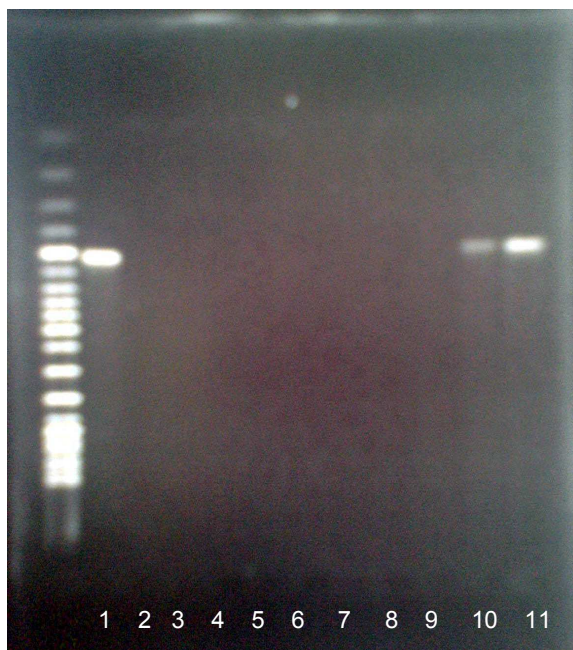


Abb. 6: Konventionelle PCR der im ELISA positiv getesteten Stuhlproben nach Binarytoxin (cdtB). Gelbeladung von links nach rechts: 1: Positivkontrolle, 2: Negativkontrolle, 3-11: Probe 107-116

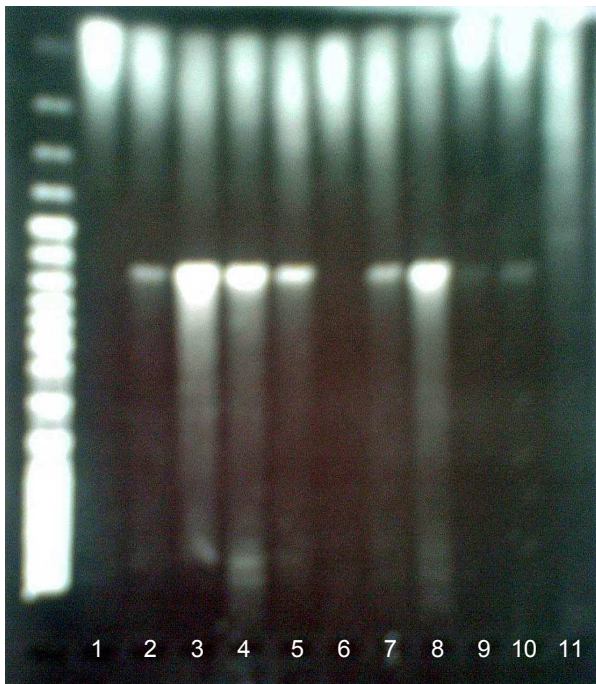


Abb.7: Konventionelle PCR der im ELISA positiv getesteten Stuhlproben nach Toxin A. Gelbeladung von links nach rechts: 1: Negativkontrolle, 2: Positivkontrolle, 3-11: Probe 34- 42

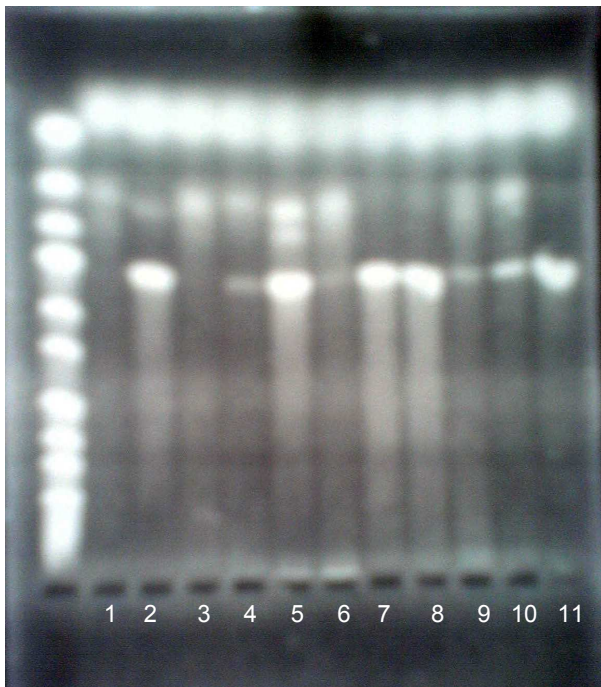


Abb.8: Konventionelle PCR der im ELISA positiv getesteten Stuhlproben nach Toxin B. Gelbeladung von links nach rechts: 1: Negativkontrolle, 2: Positivkontrolle, 3-11: Probe 64-72

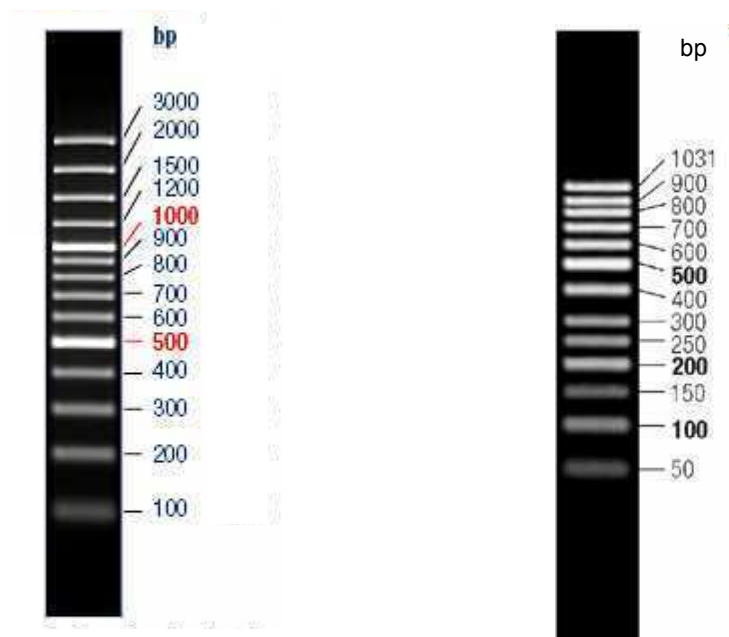


Abb. 9: Verwendete Marker: Links: 100 Basenpaar Marker
Rechts: 50 Basenpaar Marker

8. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
Abb	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaare
CDI	Clostridium difficile Infection
CFU	Colony forming units
CFU/ml	Colony forming units pro Milliliter
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	2`-Desoxyribonukleosid-5`-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii
g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
h	Stunde
HIM	Hygiene Institut Marburg
kDa	Kilo Dalton
MgCl	Magnesiumchlorid
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
PCR	Polymerase chain reaction
Pg	Picogramm
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	rounds per minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/ μ l	Units pro Mikroliter
V	Volt

9. Literaturverzeichnis

1. "Severe Clostridium difficile-associated disease in populations previously at low risk--four states, 2005." MMWR Morb.Mortal.Wkly.Rep. 54, no. 47 (December 2005):1201-05.
2. G.Ackermann, B.Loffler, Y.J.Tang-Feldman, S.H.Cohen, J.Silva, Jr., and A.C.Rodloff. "Cloning and expression of Clostridium difficile toxin A gene (tcdA) by PCR amplification and use of an expression vector." Mol.Cell Probes 18, no. 4(August 2004):271-74.
3. T.Akerlund, B.Svenungsson, A.Lagergren, and L.G.Burman. "Correlation of disease severity with fecal toxin levels in patients with Clostridium difficile-associated diarrhea and distribution of PCR ribotypes and toxin yields in vitro of corresponding isolates." J.Clin.Microbiol. 44, no. 2 (February 2006):353-58.
4. T.Akerlund, I.Persson, M.Unemo, T.Noren, B.Svenungsson, M.Wullt, and L.G.Burman. "Increased sporulation rate of epidemic Clostridium difficile Type 027/NAP1." J.Clin.Microbiol. 46, no. 4(April 2008):1530-33.
5. M.J.Alfa, A.Kabani, D.Lyerly, S.Moncrief, L.M.Neville, A.Al-Barrak, G.K.Harding, B.Dyck, K.Olekson, and J.M.Embil. "Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of Clostridium difficile responsible for a nosocomial outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea." J.Clin.Microbiol. 38, no. 7(July 2000):2706-14.
6. F.Barbut, M.Delmee, J.S.Brazier, J.C.Petit, I.R.Poxton, M.Rupnik, V.Lalande, C.Schneider, P.Mastrantonio, R.Alonso, E.Kuipjer, and M.Tvede. "A European survey of diagnostic methods and testing protocols for Clostridium difficile." Clin.Microbiol.Infect. 9, no. 10(October 2003):989-96.
7. H.Barth, K.Aktories, M.R.Popoff, and B.G.Stiles. "Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins." Microbiol.Mol.Biol.Rev. 68, no. 3(September 2004):373-402, table.
8. J.G.Bartlett, T.W.Chang, M.Gurwith, S.L.Gorbach, and A.B.Onderdonk. "Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia." N.Engl.J.Med. 298, no. 10(March 1978):531-34.

-
9. J.G.Bartlett. "Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea." *N.Engl.J.Med.* 346, no. 5(January 2002):334-39.
 10. J.G.Bartlett. "Clostridium difficile-associated Enteric Disease." *Curr.Infect.Dis.Rep.* 4, no. 6(December 2002):477-83.
 11. S.D.Belanger, M.Boissinot, N.Claïroux, F.J.Picard, and M.G.Bergeron. "Rapid detection of Clostridium difficile in feces by real-time PCR." *J.Clin.Microbiol.* 41, no. 2(February 2003):730-34.
 12. S.P.Borriello and P.Honour. "Simplified procedure for the routine isolation of Clostridium difficile from faeces." *J.Clin.Pathol.* 34, no. 10(October 1981):1124-27.
 13. S.P.Borriello and M.H.Wilcox. "Clostridium difficile infections of the gut: the unanswered questions." *J.Antimicrob.Chemother.* 41 Suppl C,(May 1998):67-69.
 14. S.Bures, J.T.Fishbain, C.F.Uyehara, J.M.Parker, and B.W.Berg. "Computer keyboards and faucet handles as reservoirs of nosocomial pathogens in the intensive care unit." *Am.J.Infect.Control* 28, no. 6(December 2000):465-71.
 15. M.Chernesky, S.Castriciano, D.Jang, and M.Smieja. "Use of flocked swabs and a universal transport medium to enhance molecular detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae." *J.Clin.Microbiol.* 44, no. 3(March 2006):1084-86.
 16. S.H.Cohen, Y.J.Tang, and J.Silva, Jr. "Analysis of the pathogenicity locus in Clostridium difficile strains." *J.Infect.Dis.* 181, no. 2(February 2000):659-63.
 17. S.T.Dillon, E.J.Rubin, M.Yakubovich, C.Pothoulakis, J.T.LaMont, L.A.Feig, and R.J.Gilbert. "Involvement of Ras-related Rho proteins in the mechanisms of action of Clostridium difficile toxin A and toxin B." *Infect.Immun.* 63, no. 4(April 1995):1421-26.
 18. G.V.Doern, R.T.Coughlin, and L.Wu. "Laboratory diagnosis of Clostridium difficile-associated gastrointestinal disease: comparison of a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxins A and B with a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxin A only and two cytotoxicity assays." *J.Clin.Microbiol.* 30, no. 8(August 1992):2042-46.

-
19. D.Drudy, L.Kyne, R.O'Mahony, and S.Fanning. "gyrA mutations in fluoroquinolone-resistant *Clostridium difficile* PCR-027." *Emerg.Infect.Dis.* 13, no. 3(March 2007):504-05.
 20. D.Drudy, N.Harnedy, S.Fanning, M.Hannan, and L.Kyne. "Emergence and control of fluoroquinolone-resistant, toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*." *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* 28, no. 8(August 2007):932-40.
 21. D.Drudy, N.Harnedy, S.Fanning, R.O'Mahony, and L.Kyne. "Isolation and characterisation of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in Dublin, Ireland." *Clin.Microbiol.Infect.* 13, no. 3(March 2007):298-304.
 22. E.R.Dubberke, K.A.Reske, J.Noble-Wang, A.Thompson, G.Killgore, J.Mayfield, B.Camins, K.Woeltje, J.R.McDonald, L.C.McDonald, and V.J.Fraser. "Prevalence of *Clostridium difficile* environmental contamination and strain variability in multiple health care facilities." *Am.J.Infect.Control* 35, no. 5(June 2007):315-18.
 23. W.N.Fawley, S.Underwood, J.Freeman, S.D.Baines, K.Saxton, K.Stephenson, R.C.Owens, Jr., and M.H.Wilcox. "Efficacy of hospital cleaning agents and germicides against epidemic *Clostridium difficile* strains." *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* 28, no. 8(August 2007):920-25.
 24. C.Fiorentini, A.Fabbri, L.Falzano, A.Fattorossi, P.Matarrese, R.Rivabene, and G.Donelli. "*Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells." *Infect.Immun.* 66, no. 6(June 1998):2660-65.
 25. J.Freeman and M.H.Wilcox. "The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces." *J.Clin.Pathol.* 56, no. 2(February 2003):126-28.
 26. D.N.Gerding, S.Johnson, L.R.Peterson, M.E.Mulligan, and J.Silva, Jr. "*Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis." *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* 16, no. 8(August 1995):459-77.
 27. B.Geric, S.Johnson, D.N.Gerding, M.Grabnar, and M.Rupnik. "Frequency of binary toxin genes among *Clostridium difficile* strains that do not produce large clostridial toxins." *J.Clin.Microbiol.* 41, no. 11(November 2003):5227-32.

-
28. B.Geric, R.J.Carman, M.Rupnik, C.W.Genheimer, S.P.Sambol, D.M.Lyerly, D.N.Gerding, and S.Johnson. "Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters." *J.Infect.Dis.* 193, no. 8(April 2006):1143-50.
 29. C.Goncalves, D.Decre, F.Barbut, B.Burghoffer, and J.C.Petit. "Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*." *J.Clin.Microbiol.* 42, no. 5(May 2004):1933-39
 30. Grünewald, T., Kist M., Mutters, R., Ruf, B.R., Kern, B.V. – *Clostridium-difficile*-Infektion, *Dtsch Med Wochenschr* 135: 699-703, 2010
 31. A.Goorhuis, D.Bakker, J.Corver, S.B.Debast, C.Harmanus, D.W.Notermans, A.A.Bergwerff, F.W.Dekker, and E.J.Kuijper. "Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078." *Clin.Infect.Dis.* 47, no. 9(November 2008):1162-70.
 32. F.Guarner and J.R.Malagelada. "Gut flora in health and disease." *Lancet* 361, no. 9356(February 2003):512-19.
 33. I.Gulke, G.Pfeifer, J.Liese, M.Fritz, F.Hofmann, K.Aktories, and H.Barth. "Characterization of the enzymatic component of the ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*." *Infect.Immun.* 69, no. 10(October 2001):6004-11.
 34. M.P.Hensgens, A.Goorhuis, D.W.Notermans, B.H.van Benthem, and E.J.Kuijper. "Decrease of hypervirulent *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in the Netherlands." *Euro.Surveill* 14, no. 45(2009).
 35. B. L. Herpers, B. Vlamincx, O. Burkhardt, H. Blom, Hazra S. Biemond-Moeniralam, m. Hornef, T. Welte, and Edward J. Kuijper, ``Intravenous Tigecycline as Adjunctive or Alternative Therapy for Severe Refractory *Clostridium difficile* Infection`` *CID*:48,1732-1735 2009
 36. F.Hofmann, C.Busch, U.Prepens, I.Just, and K.Aktories. "Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin." *J.Biol.Chem.* 272, no. 17(April 1997):11074-78.

-
37. X.W.Huijsdens, R.K.Linskens, M.Mak, S.G.Meuwessen, C.M.Vandenbroucke-Grauls, and P.H.Savelkoul. "Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR." *J.Clin.Microbiol.* 40, no. 12(December 2002):4423-27.
 38. A.Indra, S.Huhulescu, P.Hasenberger, D.Schmid, C.Alfery, R.Wuerzner, M.Fille, K.Gattringer, E.Kuijper, and F.Allerberger. "First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Austria." *Euro.Surveill* 11, no. 9(2006):E060914.
 39. R.Joseph, D.Demeyer, D.Vanrenterghem, B.R.van den, E.Kuijper, and M.Delmee. "First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, toxinotype III in Belgium." *Euro.Surveill* 10, no. 10(October 2005):E051020.
 40. G.W.Kaatz, S.D.Gitlin, D.R.Schaberg, K.H.Wilson, C.A.Kauffman, S.M.Seo, and R.Fekety. "Acquisition of *Clostridium difficile* from the hospital environment." *Am.J.Epidemiol.* 127, no. 6(June 1988):1289-94.
 41. H.Kato, N.Kato, K.Watanabe, N.Iwai, H.Nakamura, T.Yamamoto, K.Suzuki, S.M.Kim, Y.Chong, and E.B.Wasito. "Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR." *J.Clin.Microbiol.* 36, no. 8(August 1998):2178-82.
 42. H.Kato, Y.Ito, R.J.van den Berg, E.J.Kuijper, and Y.Arakawa. "First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan." *Euro.Surveill* 12, no. 1(January 2007):E070111.
 43. K.Keel, J.S.Brazier, K.W.Post, S.Weese, and J.G.Songer. "Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species." *J.Clin.Microbiol.* 45, no. 6(June 2007):1963-64.
 44. C.P.Kelly, C.Pothoulakis, and J.T.LaMont. "*Clostridium difficile* colitis." *N.Engl.J.Med.* 330, no. 4(January 1994):257-62.
 45. C.P.Kelly and J.T.LaMont. "*Clostridium difficile* infection." *Annu.Rev.Med.* 49,(1998):375-90.

-
46. H.Kim, T.V.Riley, M.Kim, C.K.Kim, D.Yong, K.Lee, Y.Chong, and J.W.Park. "Increasing prevalence of toxin A-negative, toxin B-positive isolates of *Clostridium difficile* in Korea: impact on laboratory diagnosis." *J.Clin.Microbiol.* 46, no. 3(March 2008):1116-17.
 47. K.H.Kim, R.Fekety, D.H.Batts, D.Brown, M.Cudmore, J.Silva, Jr., and D.Waters. "Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis." *J.Infect.Dis.* 143, no. 1(January 1981):42-50.
 48. M.Komatsu, H.Kato, M.Aihara, K.Shimakawa, M.Iwasaki, Y.Nagasaka, S.Fukuda, S.Matsuo, Y.Arakawa, M.Watanabe, and Y.Iwatani. "High frequency of antibiotic-associated diarrhea due to toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in a hospital in Japan and risk factors for infection." *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 22, no. 9(September 2003):525-29.
 49. A.Kramer, I.Schwebke, and G.Kampf. "How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review." *BMC.Infect.Dis.* 6,(2006):130.
 50. E.J.Kuijper, R.J.van den Berg, S.Debast, C.E.Visser, D.Veenendaal, A.Troelstra, K.T.Van der, H.S.van den, and D.W.Notermans. "*Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III, the Netherlands." *Emerg.Infect.Dis.* 12, no. 5(May 2006):827-30.
 51. E.J.Kuijper, J.T.van Dissel, and M.H.Wilcox. "*Clostridium difficile*: changing epidemiology and new treatment options." *Curr.Opin.Infect.Dis.* 20, no. 4(August 2007):376-83.
 52. L.Kyne, M.Warny, A.Qamar, and C.P.Kelly. "Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A." *N.Engl.J.Med.* 342, no. 6(February 2000):390-97.
 53. L.Kyne, M.Warny, A.Qamar, and C.P.Kelly. "Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea." *Lancet* 357, no. 9251(January 2001):189-93.
 54. L.Kyne, M.B.Hamel, R.Polavaram, and C.P.Kelly. "Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*." *Clin.Infect.Dis.* 34, no. 3(February 2002):346-53.

-
55. D.J.Laborde, K.A.Weigle, D.J.Weber, and J.B.Kotch. "Effect of fecal contamination on diarrheal illness rates in day-care centers." *Am.J.Epidemiol.* 138, no. 4(August 1993):243-55.
 56. D.Lagrotteria, S.Holmes, M.Smieja, F.Smaill, and C.Lee. "Prospective, randomized inpatient study of oral metronidazole versus oral metronidazole and rifampin for treatment of primary episode of *Clostridium difficile*-associated diarrhea." *Clin.Infect.Dis.* 43, no. 5(September 2006):547-52.
 57. E.Larson. "A causal link between handwashing and risk of infection? Examination of the evidence." *Infect.Control* 9, no. 1(January 1988):28-36.
 58. H.E.Larson, A.B.Price, P.Honour, and S.P.Borriello. "*Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis." *Lancet* 1, no. 8073(May 1978):1063-66.
 59. J.K.Linevsky, C.Pothoulakis, S.Keates, M.Warny, A.C.Keates, J.T.LaMont, and C.P.Kelly. "IL-8 release and neutrophil activation by *Clostridium difficile* toxin-exposed human monocytes." *Am.J.Physiol* 273, no. 6 Pt 1(December 1997):G1333-G1340.
 60. S.Long, L.Fenelon, S.Fitzgerald, N.Nolan, K.Burns, M.Hannan, L.Kyne, S.Fanning, and D.Drudy. "First isolation and report of clusters of *Clostridium difficile* PCR 027 cases in Ireland." *Euro.Surveill* 12, no. 4(April 2007):E070426.
 61. V.G.Loo, L.Poirier, M.A.Miller, M.Oughton, M.D.Libman, S.Michaud, A.M.Bourgault, T.Nguyen, C.Frenette, M.Kelly, A.Vibien, P.Brassard, S.Fenn, K.Dewar, T.J.Hudson, R.Horn, P.Rene, Y.Monczak, and A.Dascal. "A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality." *N.Engl.J.Med.* 353, no. 23(December 2005):2442-49.
 62. T.J.Louie, J.Peppe, C.K.Watt, D.Johnson, R.Mohammed, G.Dow, K.Weiss, S.Simon, J.F.John, Jr., G.Garber, S.Chasan-Taber, and D.M.Davidson. "Tolevamer, a novel nonantibiotic polymer, compared with vancomycin in the treatment of mild to moderately severe *Clostridium difficile*-associated diarrhea." *Clin.Infect.Dis.* 43, no. 4(August 2006):411-20.

-
63. D.Lyras, J.R.O'Connor, P.M.Howarth, S.P.Sambol, G.P.Carter, T.Phumoonna, R.Poon, V.Adams, G.Vedantam, S.Johnson, D.N.Gerding, and J.I.Rood. "Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*." *Nature* 458, no. 7242(April 2009):1176-79.
 64. O.Lyytikainen, S.Mentula, E.Kononen, S.Kotila, E.Tarkka, V.J.Anttila, E.Mattila, M.Kanerva, M.Vaara, and V.Valtonen. "First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Finland." *Euro.Surveill* 12, no. 11(November 2007):E071108.
 65. Y.R.Mahida, S.Makh, S.Hyde, T.Gray, and S.P.Borriello. "Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment." *Gut* 38, no. 3(March 1996):337-47.
 66. L.C.McDonald, G.E.Killgore, A.Thompson, R.C.Owens, Jr., S.V.Kazakova, S.P.Sambol, S.Johnson, and D.N.Gerding. "An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*." *N.Engl.J.Med.* 353, no. 23(December 2005):2433-41.
 67. L.V.McFarland, M.E.Mulligan, R.Y.Kwok, and W.E.Stamm. "Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection." *N.Engl.J.Med.* 320, no. 4(January 1989):204-10.
 68. L.V.McFarland, M.E.Mulligan, R.Y.Kwok, and W.E.Stamm. "Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection." *N.Engl.J.Med.* 320, no. 4(January 1989):204-10.
 69. L.V.McFarland. "Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease." *Am.J.Gastroenterol.* 101, no. 4(April 2006):812-22.
 70. L.V.McFarland, J.E.Clarridge, H.W.Beneda, and G.J.Raugi. "Fluoroquinolone use and risk factors for *Clostridium difficile*-associated disease within a Veterans Administration health care system." *Clin.Infect.Dis.* 45, no. 9(November 2007):1141-51.
 71. S.McPherson, C.J.Rees, R.Ellis, S.Soo, and S.J.Panter. "Intravenous immunoglobulin for the treatment of severe, refractory, and recurrent *Clostridium difficile* diarrhea." *Dis.Colon Rectum* 49, no. 5(May 2006):640-45.

-
72. L.Monteiro, D.Bonnemaison, A.Vekris, K.G.Petry, J.Bonnet, R.Vidal, J.Cabrita, and F.Megraud. "Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model." *J.Clin.Microbiol.* 35, no. 4(April 1997):995-98.
73. K.Mullis, F.Faloona, S.Scharf, R.Saiki, G.Horn, and H.Erlich. "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 51 Pt 1,(1986):263-73.
74. D.M.Musher, N.Logan, R.J.Hamill, H.L.Dupont, A.Lentnek, A.Gupta, and J.F.Rossignol. "Nitazoxanide for the treatment of *Clostridium difficile* colitis." *Clin.Infect.Dis.* 43, no. 4(August 2006):421-27.
75. B.Nystrom. "Impact of handwashing on mortality in intensive care: examination of the evidence." *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* 15, no. 7(July 1994):435-36.
76. H.K.Park, S.S.Shim, S.Y.Kim, J.H.Park, S.E.Park, H.J.Kim, B.C.Kang, and C.M.Kim. "Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut." *J.Microbiol.* 43, no. 4(August 2005):345-53.
77. J.Penders, C.Vink, C.Driessen, N.London, C.Thijs, and E.E.Stobberingh. "Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR." *FEMS Microbiol.Lett.* 243, no. 1(February 2005):141-47.
78. J.Pepin, L.Valiquette, M.E.Alary, P.Villemure, A.Pelletier, K.Forget, K.Pepin, and D.Chouinard. "*Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity." *CMAJ.* 171, no. 5(August 2004):466-72.
79. J.Pepin, N.Saheb, M.A.Coulombe, M.E.Alary, M.P.Corriveau, S.Authier, M.Leblanc, G.Rivard, M.Bettez, V.Primeau, M.Nguyen, C.E.Jacob, and L.Lanthier. "Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec." *Clin.Infect.Dis.* 41, no. 9(November 2005):1254-60.
80. J.Pepin, M.E.Alary, L.Valiquette, E.Raiche, J.Ruel, K.Fulop, D.Godin, and C.Bourassa. "Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada." *Clin.Infect.Dis.* 40, no. 11(June 2005):1591-97.

-
81. J.Pepin, S.Routhier, S.Gagnon, and I.Brazeau. "Management and outcomes of a first recurrence of *Clostridium difficile*-associated disease in Quebec, Canada." *Clin.Infect.Dis.* 42, no. 6(March 2006):758-64.
 82. S.Perelle, M.Gibert, P.Bourlioux, G.Corthier, and M.R.Popoff. "Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196." *Infect.Immun.* 65, no. 4(April 1997):1402-07.
 83. L.R.Peterson, R.U.Manson, S.M.Paule, D.M.Hacek, A.Robicsek, R.B.Thomson, Jr., and K.L.Kaul. "Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool samples by real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea." *Clin.Infect.Dis.* 45, no. 9(November 2007):1152-60.
 84. M.R.Popoff, E.J.Rubin, D.M.Gill, and P.Boquet. "Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain." *Infect.Immun.* 56, no. 9(September 1988):2299-306.
 85. S.M.Poutanen and A.E.Simor. "*Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults." *CMAJ.* 171, no. 1(July 2004):51-58.
 86. I.R.Poxton, J.McCoubrey, and G.Blair. "The pathogenicity of *Clostridium difficile*." *Clin.Microbiol.Infect.* 7, no. 8(August 2001):421-27.
 87. T.Rinttila, A.Kassinen, E.Malinen, L.Krogus, and A.Palva. "Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR." *J.Appl.Microbiol.* 97, no. 6(2004):1166-77.
 88. K.Roberts, C.F.Smith, A.M.Snelling, K.G.Kerr, K.R.Banfield, P.A.Sleigh, and C.B.Beggs. "Aerial dissemination of *Clostridium difficile* spores." *BMC.Infect.Dis.* 8,(2008):7.
 89. A.Rodriguez-Palacios, H.R.Staempfli, T.Duffield, and J.S.Weese. "*Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada." *Emerg.Infect.Dis.* 13, no. 3(March 2007):485-87.
 90. A.Rodriguez-Palacios, H.R.Staempfli, M.Stalker, T.Duffield, and J.S.Weese. "Natural and experimental infection of neonatal calves with *Clostridium difficile*." *Vet.Microbiol.* 124, no. 1-2(September 2007):166-72.

-
91. M.Rupnik, M.Grabnar, and B.Geric. "Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains." *Anaerobe*. 9, no. 6(December 2003):289-94.
 92. M.H.Samore, L.Venkataraman, P.C.DeGirolami, R.D.Arbeit, and A.W.Karchmer. "Clinical and molecular epidemiology of sporadic and clustered cases of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea." *Am.J.Med.* 100, no. 1(January 1996):32-40.
 93. Z.Samra, S.Talmor, and J.Bahar. "High prevalence of toxin A-negative toxin B-positive *Clostridium difficile* in hospitalized patients with gastrointestinal disease." *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* 43, no. 3(July 2002):189-92.
 94. H.Sato, H.Kato, K.Koiwai, and C.Sakai. "A nosocomial outbreak of diarrhea caused by toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in a cancer center hospital." *Kansenshogaku Zasshi* 78, no. 4(April 2004):312-19.
 95. J.K.Shim, S.Johnson, M.H.Samore, D.Z.Bliss, and D.N.Gerding. "Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea." *Lancet* 351, no. 9103(February 1998):633-36.
 96. J.Silva, Jr. "*Clostridium difficile* nosocomial infections--still lethal and persistent." *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* 15, no. 6(June 1994):368-70.
 97. A.Smith. "Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypertoxin-producing strains in Canada and the US." *Euro.Surveill* 10, no. 6(2005):E050630.
 98. S.Sougioultzis, L.Kyne, D.Drudy, S.Keates, S.Maroo, C.Pothoulakis, P.J.Giannasca, C.K.Lee, M.Warny, T.P.Monath, and C.P.Kelly. "*Clostridium difficile* toxoid vaccine in recurrent *C. difficile*-associated diarrhea." *Gastroenterology* 128, no. 3(March 2005):764-70.
 99. M.H.Souza, A.A.Melo-Filho, M.F.Rocha, D.M.Lyerly, F.Q.Cunha, A.A.Lima, and R.A.Ribeiro. "The involvement of macrophage-derived tumour necrosis factor and lipoxxygenase products on the neutrophil recruitment induced by *Clostridium difficile* toxin B." *Immunology* 91, no. 2(June 1997):281-88.

-
100. J.M.Starr, H.Martin, J.McCoubrey, G.Gibson, and I.R.Poxton. "Risk factors for *Clostridium difficile* colonisation and toxin production." *Age Ageing* 32, no. 6(November 2003):657-60.
 101. S.Stubbs, M.Rupnik, M.Gibert, J.Brazier, B.Duerden, and M.Popoff. "Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*." *FEMS Microbiol.Lett.* 186,no.2(May 2000):307-12.
 102. R.H.Sunenshine and L.C.McDonald. "*Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen." *Cleve.Clin.J.Med.* 73, no. 2(February 2006):187-97.
 103. M.Tachon, C.Cattoen, K.Blanckaert, I.Poujol, A.Carbonne, F.Barbut, J.C.Petit and B. Coignard. "First cluster of *C.difficile* toxinotype III, PCR –ribotype 027 associated disease in France: preliminary report." *Euro.Surveill* 11, no. 5(200):E060
 104. Valiquette L, Cossette B., Garant MP, Diab H, Pepin J. « Impact of a reduction in the use of high-risk antibiotics on the course of an epidemic of *Clostridium difficile*-associated disease caused by the hypervirulent NAP1/027 strain `` *Clin Infect Dis.* 2007 Sep 1;45 Suppl 2:S112-21
 105. R.J.van den Berg, E.C.Claas, D.H.Oyib, C.H.Klaassen, L.Dijkshoorn, J.S.Brazier, and E.J.Kuijper. "Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping." *J.Clin.Microbiol.* 42, no. 3(March 2004):1035-41.
 106. R.J.van den Berg, E.J.Kuijper, L.E.van Coppenraet, and E.C.Claas. "Rapid diagnosis of toxinogenic *Clostridium difficile* in faecal samples with internally controlled real-time PCR." *Clin.Microbiol.Infect.* 12, no. 2(February 2006):184-86.
 107. H.Vanpoucke, B.T.De, G.Claeys, M.Vaneechoutte, and G.Verschraegen. "Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens." *Clin.Microbiol.Infect.* 7, no. 2(February 2001):55-64.
 108. E.E.Vaughan, F.Schut, H.G.Heilig, E.G.Zoetendal, W.M.de Vos, and A.D.Akkermans. "A molecular view of the intestinal ecosystem." *Curr.Issues Intest.Microbiol.* 1, no. 1(March 2000):1-12.

-
109. C.von Eichel-Streiber, R.Laufenberg-Feldmann, S.Sartingen, J.Schulze, and M.Sauerborn. "Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B." *Mol.Gen.Genet.* 233, no. 1-2(May 1992):260-68.
 110. C.von Eichel-Streiber, P.Boquet, M.Sauerborn, and M.Thelestam. "Large clostridial cytotoxins--a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins." *Trends Microbiol.* 4, no. 10(October 1996):375-82.
 111. M.Warny, J.P.Vaerman, V.Avesani, and M.Delmee. "Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection." *Infect.Immun.* 62, no. 2(February 1994):384-89.
 112. M.Warny, J.Pepin, A.Fang, G.Killgore, A.Thompson, J.Brazier, E.Frost, and L.C.McDonald. "Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe." *Lancet* 366, no. 9491(September 2005):1079-84.
 113. T.D.Wilkins and D.M.Lyerly. "*Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging." *J.Clin.Microbiol.* 41, no. 2(February 2003):531-34.
 114. T.D.Wilkins and D.M.Lyerly. "*Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging." *J.Clin.Microbiol.* 41, no. 2(February 2003):531-34.
 115. K.H.Wilson, M.J.Kennedy, and F.R.Fekety. "Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*." *J.Clin.Microbiol.* 15, no. 3(March 1982):443-46.
 116. M.M.Wroblewska, E.Swoboda-Kopec, A.Rokosz, G.Nurzynska, A.Bednarska, and M.Luczak. "Detection of *Clostridium difficile* and its toxin A (TcdA) in stool specimens from hospitalised patients." *Pol.J.Microbiol.* 54, no. 2(2005):111-15.
 117. K.A.Yearsley, L.J.Gilby, A.V.Ramadas, E.M.Kubiak, D.L.Fone, and M.C.Allison. "Proton pump inhibitor therapy is a risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea." *Aliment.Pharmacol.Ther.* 24, no. 4(August 2006):613-19.
 118. N.H.Zaiss, J.Weile, G.Ackermann, E.Kuijper, W.Witte, and U.Nuebel. "A case of *Clostridium difficile*-associated disease due to the highly virulent clone of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, March 2007 in Germany." *Euro.Surveill* 12, no. 11(November 2007):E071115.

10. Tabellarischer Lebenslauf

Die Seite 97 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

11. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Adamkiewicz	Mandrek
Basler	Martin
Baum	Moll
Bien	Moosdorf
Cordes	Mueller
Daut	Müller-Brüsselbach
Dettmeyer	Mutters
Feuser	Oertel
Gerdes	Pagenstecher
Grundmann	Pfingsten
Grzeschik	Pieper
Herrmann-Lingen	Plant
Hertl	Renz
Hilt	Richter
Jungclas	Rothmund
Kann	Röper
Käuser	Schäfer
Kim-Berger	Schmidt
Kloose	Schrader
Koolmann	Sekundo
Krieg	Steiniger
Kuckatz	Tibesku
Lang	Vogelmeier
Lenz	Wagner
Lill	Werner
Lohoff	Westermann
Maisch	Wulf
Maier	

12. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Reinier Muters für die Betreuung dieser Arbeit sowie Frau Dr. Claudia Nonnenmacher für die gute Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Helen Bykow und Claudia Trier, die mir jederzeit geduldig bei Fragen und Problemen zur Seite standen.

Herzlicher Dank auch an den geduldigen Korrekturleser.

13. Ehrenwörtliche Erklärung

“Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachberich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Untersuchung zur Etablierung einer Real-time PCR zum schnellen Screening auf *Clostridium difficile* aus Patienten- und Umgebungsproben“ im Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene unter der Leitung von Prof.Dr.med. Mutters mit Unterstützung von Dr.med.dent. C.

Nonnenmacher ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht: „The Journal Of Hospital Infection (2009) 71, 43-48“

Titel der Veröffentlichung: „Quantitative detection of *Clostridium difficile* in hospital environmental samples by real-time polymerase chain reaction“